

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DÉBORA REBECHI

Efeitos ecotoxicológicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) expostos ao Malathion

CURITIBA

2012

DÉBORA REBECHI

Efeitos ecotoxicológicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) expostos ao Malathion

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Entomologia, Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Entomologia.

Orientador: Prof. Dr. Mário Antônio Navarro da Silva

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helena Cristina da Silva de Assis


CURITIBA

2012

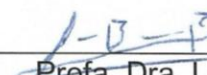
DÉBORA REBECHI

“Efeitos ecotoxicológicos em *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981
(DIPTERA: CHIRONOMIDAE) expostos ao Malathion”

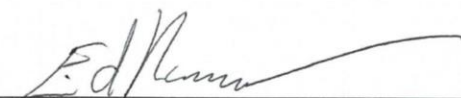
Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de “Mestre
em Ciências Biológicas”, no Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Área de Concentração em Entomologia, da Universidade Federal
do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof. Dr. Dr. Mário Antonio Navarro da Silva (Orientador)
(UFPR)



Profa. Dra. Liane Biehl Printes
(USP)



Prof. Dr. Eduardo Novaes Ramires
(UFPR)

Curitiba, 15 de fevereiro de 2012.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Entomologia por toda a estrutura fornecida para a realização do trabalho.

Ao Prof. Mário, pela orientação, paciência, dedicação, conselhos e especialmente pela oportunidade e confiança em mim depositada para a execução de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

À Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis, pela co-orientação, disponibilização do seu laboratório e auxílio com os ensaios enzimáticos.

Aos professores do curso de Pós-graduação em Entomologia pelas aulas e contribuição em minha formação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo.

Aos meus colegas do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV), Adriana, Ana, Betina, Gerson, Gisele, Isabel, Lígia, Mário, Oscar e Rodrigo por todos os momentos de confraternização e convivência no laboratório, vocês fizeram com que esses dois anos passassem rápido demais, especialmente a Maiara por toda a ajuda durante a parte prática do trabalho e ao Vinicius, pelas incansáveis discussões e resolução das diversas questões que o trabalho com Chironomidae envolve, além da eterna amizade e confiança.

À Cris, do Laboratório de Toxicologia Aquática, pelas conversas e grande ajuda nos protocolos enzimáticos.

A todos os meus amigos: do colégio, da graduação e da pós-graduação, que estavam ao meu lado em todos os momentos nesses dois anos.

A toda minha família, avós, tios, primos, que mesmo de longe vivem me apoiando.

As minhas queridas irmãs, Denise e Viviane, aos meus cunhados, Yuri e Cristiano e as minhas sobrinhas lindas, Letícia e Bianca, pela presença constante, apoio e alegria que vocês me passam.

Ao meu amor Rafael, por todos os incríveis momentos juntos, conselhos, dedicação, segurança e confiança. Você me faz muito feliz.

Aos meus pais, Vilson e Solange, pessoas muito importantes para mim e que sempre estão ao meu lado, agradeço o apoio, dedicação, a preocupação, ao carinho e amor incondicional. Vocês são os melhores.

Com carinho,
Débora

RESUMO

Os inseticidas organofosforados são compostos utilizados pelo ser humano em agrossistemas e em programas de controle de vetores de patógenos. Por serem constantemente aplicados podem atingir os corpos d'água, afetando toda a biota aquática. O objetivo deste trabalho foi avaliar através dos biomarcadores bioquímicos atividades da acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) os efeitos da exposição aguda e crônica da espécie *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) ao inseticida organofosforado malathion, além disso verificar efeitos na população através da fecundidade potencial das fêmeas da espécie. Os organismos foram provenientes de uma colônia de criação do Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) mantida em sala de criação com temperatura 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), fotoperíodo (12h claro/12h escuro) e umidade 80% ($\pm 10\%$) controlados. Foram realizados cinco bioensaios de toxicidade aguda (96h) com cinco concentrações (0,1; 0,25; 1,37; 1,96 e 2,51 $\mu\text{g.L}^{-1}$) do inseticida e dois bioensaios de toxicidade crônica (17 dias) com duas concentrações (0,1; 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$) de malathion. Grupos controles com álcool como solvente foram mantidos em paralelo para cada teste. Foram analisadas 50 larvas por concentração para cada enzima quantificada, totalizando 1350 larvas. A fecundidade potencial das fêmeas provenientes do bioensaio de toxicidade crônica foi quantificada através da relação existente entre este parâmetro e o comprimento da asa das fêmeas. No total foram mensuradas 173 asas do controle, 127 asas da concentração 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 170 asas da concentração 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, as quais emergiram do 8º ao 17º dia de bioensaio. As enzimas AChE, EST - α e EST - β tiveram as suas atividades diminuída tanto pela exposição aguda quanto crônica e em todas as concentrações do inseticida malathion. A fecundidade potencial das fêmeas sofreu uma redução de 13% na concentração 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, a qual é o valor máximo permitido pelo CONAMA para o malathion para rios de classe 1, porém na concentração de 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ não foram observadas alterações significativas, impedindo assim uma conclusão de como este produto afeta a fecundidade da espécie. Entretanto, verificou-se que pequenas concentrações do inseticida malathion causam alterações no metabolismo individual das larvas de *C. sancticaroli*, indicando assim alta toxicidade e risco ambiental deste composto para a espécie.

Palavras-chaves: Biomarcadores enzimáticos; fecundidade; malathion.

ABSTRACT

The organophosphate compounds are used by humans in agro-systems and programs to control vectors of pathogens. Because they are consistently applied can reach water bodies, affecting all aquatic biota. The objective of this study was to evaluate biochemical biomarkers through the activities of acetylcholinesterase (AChE), alpha esterase (EST- α) and beta esterase (EST- β) the effects of acute and chronic exposure of the species *Chironomus sancticaroli* Strixino & Strixino, 1981 (Diptera: Chironomidae) to the organophosphate insecticide malathion also check through effects on the population of potential fecundity of females of the species. The organisms were from a colony of creation of the Laboratory of Entomology Medical and Veterinary (LEMV), Federal University of Paraná (UFPR) maintained at room setting temperature 25°C (\pm 2°C), photoperiod (12h claro/12h dark) and humidity 80% (\pm 10%) controlled. Were conducted five acute bioassays (96h) with five concentrations (0.1, 0.25, 1.37, 1.96 and 2.51 $\mu\text{g.L}^{-1}$) of the insecticide and two chronic bioassays (17 days) with two concentrations (0.1, 0.25 $\mu\text{g.L}^{-1}$) of malathion. Groups with alcohol as solvent controls were maintained in parallel for each test. We analyzed 50 larvae per concentration for each enzyme measured, totaling 1,350 larvae. The potential fecundity of females from the chronic toxicity bioassay was quantified using the relationship between this parameter and wing length of females. In total 173 were measured in control wings, 127 wings of concentration 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ and 170 wings of 0.25 $\mu\text{g.L}^{-1}$, which emerged from the 8th to the 17th day of bioassay. The enzymes AChE, EST- α and EST- β had their activities decreased by both acute and chronic exposure at all concentrations of the insecticide malathion. The potential fecundity of females was reduced by 13% in the concentration 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$, which is the maximum permitted by CONAMA to malathion for rivers of Class 1, but the concentration of 0.25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ no significant changes were observed, thus preventing a conclusion on how this product affects the fertility of the species. However, it was found that small concentrations of the insecticide malathion cause changes in the metabolism of individual larvae of *C. sancticaroli*, indicating high toxicity and environmental risk of this compound for the species

Key-words: Enzymatic biomarkers, fecundity, malathion.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Reação de degradação da acetilcolina	18
FIGURA 2:	Estrutura química do inseticida malathion	18
FIGURA 3:	Ciclo de vida de <i>Chironomus sancticaroli</i>	21
FIGURA 4:	Aquários utilizados para a criação da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> em sala de criação com condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($80 \pm 10\%$) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). 1 – Aquário tipo 1 (dimensões: 60 cm x 40 cm x 35 cm; com capacidade para 85 L); 2 – Aquários tipo 2 (dimensões: 25 cm x 15 cm x 25 cm; com capacidade para 10 L).....	27
FIGURA 5:	Sala de criação com imagens das bandejas utilizadas para a separação das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> para realização dos bioensaios. 1 – Aspecto geral da disposição das bandejas na sala; 2 – Detalhe da bandeja (dimensões: 38 cm x 24 cm x 8 cm; com capacidade para 7 L) contendo larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial e aeração constante	28
FIGURA 6:	Representação esquemática dos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio (KCl) em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial para avaliar a qualidade da população de <i>Chironomus sancticaroli</i> mantida em laboratório. Foram utilizadas cinco concentrações mais o controle com água, cada tratamento apresentou três réplicas, cada uma contendo seis larvas da espécie	30
FIGURA 7:	Concentrações Letais CL50 – 96h (g.L^{-1}) para cada um dos 10 testes realizados, bem como o limite superior e inferior da faixa sensibilidade de <i>Chironomus sancticaroli</i> ao Cloreto de Potássio (KCl)	31
FIGURA 8:	Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade aguda com o composto malathion em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial de <i>Chironomus sancticaroli</i> para as calibrações das concentrações letais (CLs). Foram utilizadas oito concentrações mais o controle com álcool, cada tratamento apresentou quatro réplicas, cada uma contendo dez larvas da espécie	32
FIGURA 9:	Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade aguda com cinco concentrações (0,1; 0,25; 1,37; 1,96 e $2,51 \mu\text{g.L}^{-1}$) do composto malathion mais o controle contendo álcool, em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial de <i>Chironomus sancticaroli</i> , para posterior análise enzimática.	35
FIGURA 10:	Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade crônica com duas concentrações (0,1 e $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) do composto malathion mais o controle contendo álcool, durante o ciclo de vida inteiro de <i>Chironomus sancticaroli</i>	36

FIGURA 11: Representação esquemática da distribuição das massas ovígeras no bioensaio de toxicidade crônica de <i>Chironomus sancticaroli</i>	37
FIGURA 12: Método empregado para se obter o comprimento das asas das fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> . 1 – Lupa SteREO Discovery V.20 com câmera Zeiss utilizada para tirar as fotos das asas das fêmeas; 2 – Asa da fêmea indicando os pontos utilizados para a medida de comprimento (Alula – ápice da asa)	38
FIGURA 13: Experimento do efeito do jejum das larvas de <i>Chironomus sancticaroli</i> . 1 - Detalhe do recipiente utilizado no experimento; 2 – Aspecto geral do interior do recipiente com indicação da única larva utilizada	40
FIGURA 14: Imagem da microplaca do ensaio enzimático com a enzima acetilcolinesterase (AChE) indicando a reação colorida gerada no experimento. Nesta placa cada número representa um indivíduo testado, com suas respectivas quatro réplicas uma embaixo da outra. Foi realizado ensaio com dez organismos na metade superior da placa e dez na metade inferior da placa. As quatro réplicas do branco estão representadas pela letra B	42
FIGURA 15: Imagem da microplaca do ensaio enzimático com a enzima esterase alfa (EST - α) indicando a reação colorida gerada no experimento. Nesta placa cada número representa um indivíduo testado, com suas respectivas quatro réplicas uma embaixo da outra. Foi realizado ensaio com dez organismos na metade superior da placa e dez na metade inferior da placa. As quatro réplicas do branco estão representadas pela letra B e o controle positivo pelas letras CP.....	43
FIGURA 16: Imagem da microplaca do ensaio enzimático com a enzima esterase beta (EST - β) indicando a reação colorida gerada no experimento. Nesta placa cada número representa um indivíduo testado, com suas respectivas quatro réplicas uma embaixo da outra. Foi realizado ensaio com dez organismos na metade superior da placa e dez na metade inferior da placa. As quatro réplicas do branco estão representadas pela letra B e o controle positivo pelas letras CP	44
FIGURA 17: Imagem da microplaca do ensaio enzimático para a quantificação da proteína total, indicando a reação colorida gerada no experimento. Nesta placa cada número representa um indivíduo testado, com suas respectivas quatro réplicas uma embaixo da outra. Foi realizado ensaio com dez organismos na metade superior da placa e dez na metade inferior da placa. As réplicas do branco estão representadas pela letra B.....	45
FIGURA 18: Fluxograma indicativo de todas as atividade realizadas	46
FIGURA 19: Toxicidade aguda (96h) de cinco concentrações do inseticida malathion comparadas com o controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE); esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> . Os resultados expressam média da atividade	

enzimática \pm erro padrão (n = 50 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA - one way e os contrastes de Tukey).....	48
FIGURA 20: Toxicidade crônica de duas concentrações do inseticida malathion comparadas ao controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> . Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 50 para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA - one way e os contrastes de Tukey).....	49
FIGURA 21: Número diário de machos e fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> provenientes do primeiro bioensaio de toxicidade crônica (17 dias) com duas concentrações do inseticida malathion. A – controle; B – concentração de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$; C – concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$. As barras pretas simbolizam o número de machos e as barras cinzas o número de fêmeas	51
FIGURA 22: Número diário de machos e fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> provenientes do segundo bioensaio de toxicidade crônica (17 dias) com duas concentrações do inseticida malathion. A – controle; B – concentração de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$; C – concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$. As barras pretas simbolizam o número de machos e as barras cinzas o número de fêmeas	52
FIGURA 23: Tamanho médio diário das asas das fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> provenientes do segundo bioensaio de toxicidade crônica (17 dias) com duas concentrações ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) do inseticida malathion.	53
FIGURA 24: Fecundidade potencial das fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> expostas a duas concentrações ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) do inseticida malathion em bioensaios de toxicidade crônica (17 dias). Os resultados expressam média da fecundidade potencial \pm erro padrão (n = 173 para controle, 127 para concentração $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e 173 para concentração $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA – one way e os contrastes de Tukey).....	54
FIGURA 25: Efeito da centrifugação das amostras na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> . Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T pareado).....	55
FIGURA 26: Efeito do congelamento das amostras na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> . Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T pareado).....	56

- FIGURA 27: Efeito da temperatura (20, 25 e 30°C) de criação das larvas na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticaroli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA – one way e os contrastes de Tukey).57
- FIGURA 28: Efeito do jejum por 24 horas das larvas na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticaroli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T não pareado).58
- FIGURA 29: Efeito do jejum por 48 horas das larvas na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticaroli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T não pareado).59
- FIGURA 30: Efeito do jejum por 72 horas das larvas na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticaroli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T não pareado).60

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Valores da Concentração Letal (CL_{50} – 96h, $g.L^{-1}$) do Cloreto de Potássio (KCl) e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de sensibilidade com <i>Chironomus sancticaroli</i>	31
TABELA 2:	Faixa letal do composto malathion para a espécie <i>Chironomus sancticaroli</i> expressa em $\mu g.L^{-1}$ e seus intervalos de confiança (IC)	49
TABELA 3:	Número total de machos e fêmeas de <i>Chironomus sancticaroli</i> provenientes dos dois bioensaios de toxicidade crônica realizados com duas concentrações 0,1 $\mu g.L^{-1}$ e 0,25 $\mu g.L^{-1}$ do inseticida malathion.....	54

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Classificação toxicológica dos pesticidas de acordo com Almeida (2002).....	17
QUADRO 2: Classificação das águas-doces de Classe 1 e 3 segundo CONAMA (resolução 357, de 17 de março de 2005).....	19
QUADRO 3: Aplicabilidade dos testes de toxicidade segundo Aragão & Araújo (2008).....	22

LISTA DE SIGLAS

ACh	Neurotransmissor acetilcolina
AChE	Enzima acetilcolinesterase
ATC	Iodeto de acetiltiocolina
BChE	Butirilcolinesterase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
CENO	Concentração de efeito não observado
CL₁₀	Concentração letal que mata 10% da população
CL₃₀	Concentração letal que mata 30% da população
CL₅₀	Concentração letal que mata 50% da população
CLs	Concentrações letais
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
ChE	Colinesterases
DL₅₀	Dose Letal que mata 50% da população
DTNB	5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato
EST –α	Enzima esterase alfa
EST – β	Enzima esterase beta
GST	Enzima glutathiona S-transferase
LEMV	Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária
OF	Organofosforados
PChE	Pseudocolinesterase
PNCD	Programa Nacional de Controle da Dengue
PTN	Proteína total
UFPR	Universidade Federal do paraná
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
≤	Menor ou igual
®	Marca registrada
cm	Centímetros
CV	Coeficiente de variação
g	Gramas
h	Horas
KCl	Cloreto de potássio
L	Litros
log	Logarítmo
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
nm	Nanômetros
°C	Graus Celsius
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
S	Desvio Padrão
S²	Variância
X	Média
x²	Qui-quadrado
μg	Microgramas
μl	Microlitros
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL.....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	INSETICIDAS	17
3.1.1	Inseticidas organofosforados	18
3.1.1.1	Malathion	18
3.2	FAMÍLIA CHIRONOMIDAE	20
3.2.1	Espécie <i>Chironomus sancticaroli</i>	20
3.3	ECOTOXICOLOGIA.....	22
3.3.1	Ensaio de toxicidade.....	22
3.3.1.1	Ensaio de toxicidade aguda	23
3.3.1.2	Ensaio de toxicidade crônica	23
3.3.2	Biomarcadores	23
3.3.2.1	Esterases	24
3.3.2.1.1	Biomarcadores de neurotoxicidade.....	25
3.3.2.1.1.1	Enzima acetilcolinesterase (AChE)	25
3.3.2.1.2	Biomarcadores de biotransformação.....	25
3.3.2.1.2.1	Enzimas esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β)	25
3.3.3	Parâmetro fecundidade.....	26
4	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	MATERIAL BIOLÓGICO.....	27
4.2	CRIAÇÃO DA ESPÉCIE <i>Chironomus sancticaroli</i>	27
4.3	AValiação da população de <i>Chironomus sancticaroli</i>	29
4.4	BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA.....	32
4.4.1	Determinação das concentrações letais	32
4.4.2	Exposição ao malathion	34
4.5	BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA	35
4.6	EFEITOS POPULACIONAIS.....	37
4.6.1	Adultos de <i>Chironomus sancticaroli</i>	37
4.6.2	Fecundidade potencial.....	37

4.7	CALIBRAÇÃO DO PROTOCOLO DOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS	38
4.7.1	Efeito da centrifugação das amostras	39
4.7.2	Efeito do congelamento das amostras	39
4.7.3	Efeito da temperatura de criação das larvas.....	39
4.7.4	Efeito do jejum nas larvas	40
4.8	ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	41
4.8.1	Preparação das larvas para os ensaios enzimáticos	41
4.8.1.1	Congelamento	41
4.8.1.2	Homogeneização e centrifugação	41
4.8.2	Enzima acetilcolinesterase (AChE).....	41
4.8.3	Enzima esterase alfa (EST - α)	42
4.8.4	Enzima esterase beta (EST - β)	43
4.8.5	Proteína total (PTN).....	44
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
4.10	FLUXOGRAMA DE TRABALHO	46
5	RESULTADOS	47
5.1	CONCENTRAÇÕES LETAIS	47
5.2	ENSAIOS ENZIMÁTICOS.....	48
5.2.1	Exposição aguda ao malathion	48
5.2.2	Exposição crônica ao malathion	49
5.3	EFEITOS POPULACIONAIS.....	50
5.3.1	Adultos de <i>Chironomus sancticarioli</i>	50
5.3.2	Fecundidade potencial.....	53
5.4	CALIBRAÇÃO DO PROTOCOLO DOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS	55
5.4.1	Efeito da centrifugação das amostras	55
5.4.2	Efeito do congelamento das amostras	56
5.4.3	Efeito da temperatura de criação das larvas.....	57
5.4.4	Efeito do jejum das larvas	58
6	DISCUSSÃO	61
7	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS.....	72

1 INTRODUÇÃO

As substâncias tóxicas ocorrem naturalmente no ambiente e sua distribuição é relativamente constante devido principalmente aos processos biológicos naturais, que causam tanto a degradação quanto a sua síntese (Wood, 1974). Porém, à medida que a humanidade amplia sua capacidade tecnológica de intervir na natureza, para satisfazer suas necessidades crescentes, surgem os conflitos quanto ao uso do espaço, dos recursos e da disposição dos resíduos no ambiente (Zagatto, 2008), os quais afetam a ação natural dos organismos de tal maneira que o equilíbrio gerado pela degradação não pode mais ser mantido, resultando no aumento da poluição ambiental.

O ambiente aquático não é um compartimento de diluição infinita da poluição gerada, vários são os exemplos em que se pode perceber a interferência do homem nesses ambientes, como as frequentes florações de algas, promovidas pelo excesso de matéria orgânica (eutrofização), a qual reduz significativamente o nível de oxigênio dissolvido na água, levando ao decréscimo da qualidade da água visualizada através da mortandade de peixes e até mesmo a morte de rios (Zagatto, 2008). Além disso, os produtos químicos amplamente utilizados pelo ser humano frequentemente alcançam os corpos hídricos através do processo de lixiviação dos solos, lavagem da vegetação e escoamento superficial de águas pluviais (Mozeto & Zagatto, 2008).

Incluídos nesse cenário estão os macroinvertebrados bentônicos de água doce, os quais são definidos como invertebrados que habitam o fundo de ecossistemas aquáticos durante pelo menos uma fase do seu ciclo de vida, dentre eles são mais abundantemente encontrados o táxon Insecta e mais especificamente a família Chironomidae (Diptera) (Ribeiro & Uieda, 2005).

Estes organismos são afetados pelos compostos utilizados e liberados pelo homem nos corpos hídricos, portanto, faz-se necessário o estudo dos efeitos causados nos indivíduos para que sejam previstos e monitorados distúrbios populacionais ou em níveis hierárquicos superiores com a intenção de evitar impactos maiores nos ecossistemas aquáticos, os quais são de fundamental importância para o equilíbrio da vida no planeta.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos da exposição aguda e crônica da espécie *Chironomus sancticaroli* ao inseticida organofosforado malathion através de ensaios enzimáticos e custos reprodutivos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações letais e sub-letais do inseticida malathion através de testes toxicológicos agudos e crônicos em imaturos de *Chironomus sancticaroli*;
- Aplicar e validar o protocolo de quantificação das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) em larvas de *Chironomus sancticaroli* avaliando o efeito da temperatura de criação, estado nutricional, centrifugação e congelamento das amostras;
- Verificar os efeitos do inseticida malathion através da quantificação das atividades enzimáticas das três enzimas em imaturos de *Chironomus sancticaroli*;
- Avaliar os custos reprodutivos em adultos de *Chironomus sancticaroli* expostos cronicamente ao inseticida malathion.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 INSETICIDAS

Pesticidas são compostos químicos utilizados pelo ser humano para destruir ou controlar alguma forma de vida indesejada (ácaros, fungos, insetos, nematódeos, plantas daninhas, ratos, etc.). Podem ser classificados de muitas maneiras, de acordo com o seu estado físico, propósito de aplicação, natureza química, modo de ação, origem. Quando são classificados baseando-se no organismo alvo aos quais exercem suas funções, podem ser: acaricidas, fungicidas, inseticidas, nematocidas, herbicidas, raticidas entre outros (Alonzo & Corrêa, 2008). São classificados também de acordo com a sua toxicidade (Quadro 1).

QUADRO 1: Classificação toxicológica dos pesticidas de acordo com Almeida (2002).

- Classe toxicológica I (rótulo vermelho): altamente tóxicos para a saúde humana, DL_{50} de 5 mg/Kg ou menos (algumas gotas podem causar a morte em humanos);
- Classe toxicologia II (rótulo amarelo): moderadamente tóxicos para a saúde humana, DL_{50} de 5-50 mg/Kg (algumas gotas ou uma colher de chá podem causar a morte em humanos);
- Classe toxicológica III (rótulo azul): pouco tóxicos aos humanos, DL_{50} de 50-500 mg/Kg (uma colher de chá a duas colheres de sopa podem causar a morte em humanos);
- Classe toxicológica IV (rótulo verde): pouco tóxico, DL_{50} de 500-5000 mg/Kg (uma colher de sopa a um copo podem causar a morte em humanos);
- Classe toxicológica V (rótulo verde): muito pouco tóxico, DL_{50} de 5000 mg/Kg ou mais (um copo a um litro podem causar a morte em humanos).

Os inseticidas atuam sobre o sistema nervoso central dos insetos, por isso são amplamente utilizados na agricultura para o controle de pragas e em programas de prevenção e controle de doenças transmitidas por vetores. São classificados em quatro classes: organoclorados; organofosforados; carbamatos e piretróides (Braga & Valle, 2007a).

3.1.1 Inseticidas organofosforados

Os compostos organofosforados (OF) são ésteres de ácido fosfórico. Atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (AChE) através da sua ligação ao centro esterásico da AChE, dessa forma a enzima deixa de realizar sua função que é hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh) em colina e ácido acético (Figura 1) nas fendas sinápticas. Assim o neurotransmissor fica constantemente transmitindo impulsos nervosos, o que leva a hiper excitação do sistema nervoso, resultando em espasmos e morte (Fulton & Key, 2001). Esta ligação é irreversível, em condições naturais, devido a alta afinidade química entre o composto e a enzima.

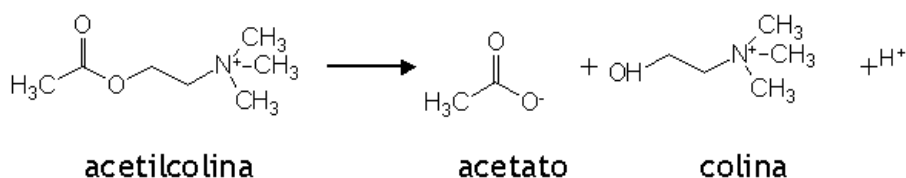


FIGURA 1: Reação de degradação da acetilcolina

3.1.1.1 Malathion

O malathion, O,O-dimethyl dithiophosphate of diethyl mercapto succinate (Figura 2) é um inseticida organofosforado sintético de classe toxicológica I, o qual apresenta-se como líquido a temperatura ambiente, possui coloração castanha-amarelada e odor semelhante ao alho. É solúvel em etanol e acetona e muito solúvel em éter etílico (ATSDR, 2003). Entra em contato com o meio ambiente através de sua pulverização manual provenientes de algumas atividades antrópicas.

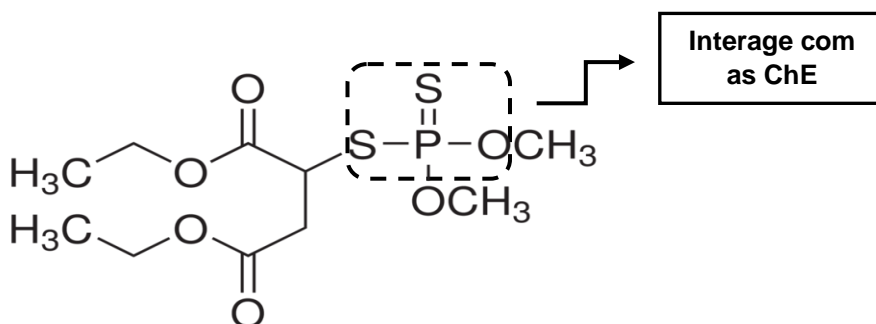


FIGURA 2: Estrutura química do inseticida malathion

Por ser um inseticida de amplo espectro é utilizado em agrossistemas para controlar diversas pragas. De acordo com a Secretaria de Estado da Agricultura e

Abastecimento do Paraná (2011) o seu uso no estado está liberado para as culturas de algodão, citros, maçã, pêssego, repolho e tomate. Sua aplicação se estende também a programas de controle de vetores de patógenos, como por exemplo, o Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD), implantado em 2002 no Brasil com o objetivo de controlar e monitorar a resistência do mosquito transmissor do vírus da dengue *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Braga & Valle, 2007b).

A Legislação Brasileira (resolução 357, de 17 de março de 2005, CONAMA) estabelece o valor máximo de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o malathion em águas-doces de Classe 1 e $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ para águas-doces de Classe 3 (Quadro 2).

QUADRO 2: Classificação das águas-doces de Classe 1 e 3 segundo CONAMA (resolução 357, de 17 de março de 2005).

Classe 1 – águas destinadas:

- ao abastecimento doméstico após tratamento simplificado;
- à preservação do equilíbrio natural das comunidades aquáticas;
- à recreação de contato primário;
- à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que são ingeridas sem remoção de película;
- à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas.

Classe 3 – águas destinadas:

- ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;
- à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- à pesca amadora;
- à recreação de contato secundário;
- à dessedentação de animais.

O malathion é degradado através da exposição à luz solar ou por bactérias do solo e da água, apresentando uma meia vida de 1,65 dias (pH 8) ou 17 dias (pH 6). Seu metabólito primário é o malaoxon, o qual pode ser até 33 vezes mais tóxico, porém é um composto menos estável que o malathion, podendo ser rapidamente degradado em um metabólito não tóxico (NPIC, 2010). Esta conversão da forma **thion** para a **oxon** é realizada pelas monoxigenases, nos organismos expostos ao malathion e é este composto que será responsável pela inibição da AChE (Hemingway & Ranson, 2000). Porém enzimas de detoxificação como as esterases alfa (EST- α) e esterases beta (EST- β) são responsáveis pela remoção desses

compostos tóxicos, podendo levar a um quadro de resistência metabólica em insetos (Hemingway & Karunaratne, 1998).

3.2 FAMÍLIA CHIRONOMIDAE

A família Chironomidae é comumente conhecida por possuir distribuição geográfica mundial (incluindo os pólos) e nos locais onde as espécies são encontradas apresentam-se frequentemente em grande abundância de espécimes. Esse fato pode ser explicado através dos mais diversos aspectos biológicos singulares que as 15.000 espécies da família apresentam (Coffman, 1995; Osborne *et al.*, 2000; Nyman *et al.*, 2005).

Estes organismos possuem grande potencial de adaptação aos diferentes ambientes da Terra, por isso algumas espécies podem ser encontradas até em locais considerados inóspitos para a maioria dos insetos, como em geleiras polares, nascentes termais, lagos profundos, corpos de água temporários, águas salobras e marinhas (Pinder, 1995; Michaud *et al.*, 2008; Jonusaite *et al.*, 2011).

Evidentemente não são todas as espécies de Chironomidae que sobrevivem a esses ambientes exóticos, a grande maioria habita principalmente ecossistemas aquáticos de água-doce. No entanto, até mesmo dentre esses organismos existem algumas espécies capazes de tolerar situações ambientais mais adversas, como por exemplo, baixos níveis de oxigênio dissolvido na água, eutrofização ou poluição (Choi *et al.*, 2001; Rufer & Ferrington, 2008; Lagauzère *et al.*, 2009). Muitos estudos atribuem essa tolerância ao fato de algumas espécies apresentarem o pigmento respiratório hemoglobina na hemolinfa das larvas (Lee *et al.*, 2006; Anderson *et al.*, 2008; Lee & Choi, 2009).

3.2.1 Espécie *Chironomus sancticaroli*

A espécie *Chironomus sancticaroli*, foi descrita por Strixino & Strixino em 1981, a partir de exemplares encontrados na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, Brasil. São insetos holometábolos, portanto, apresentam ciclo de vida completo: ovo, larva, pupa e adultos (Figura 3), sendo que as três primeiras fases do ciclo de vida são aquáticas e os adultos são terrestres (Strixino & Strixino, 1981).

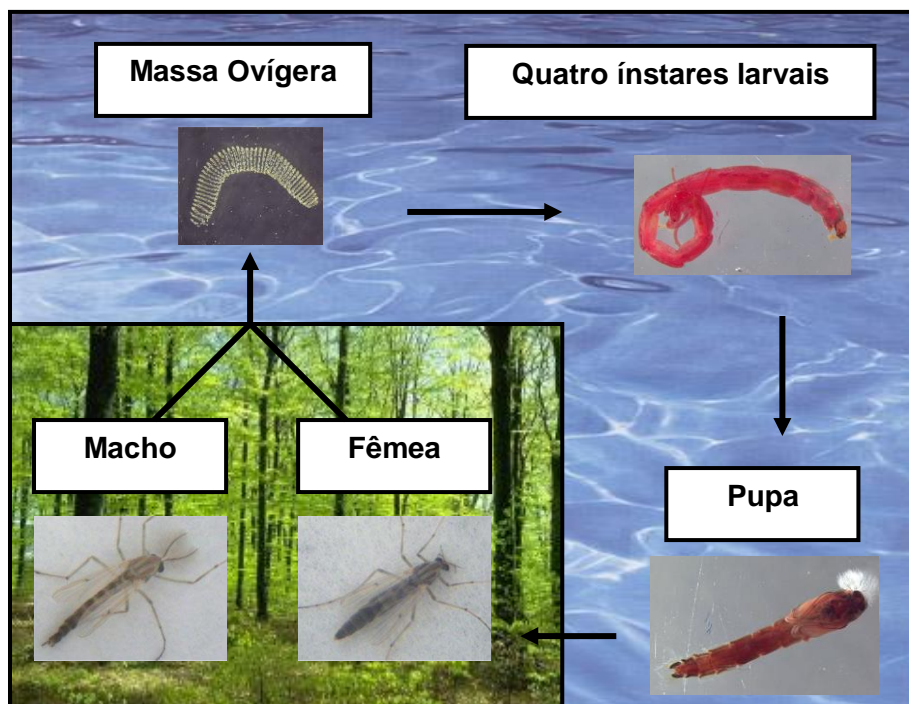


FIGURA 3: Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli*

Os adultos não se alimentam e possuem tempo de vida efêmero de aproximadamente quatro dias, portanto, esta fase do ciclo de vida é restritamente direcionada a reprodução (Strixino & Strixino, 1981). A espécie possui de 16 a 18 gerações ao ano (Strixino & Trivinho-Strixino, 1985), esta variação está relacionada principalmente com a temperatura, diferenças de apenas 5° C fazem o tempo do ciclo de vida dobrar, portanto, no período do ano em que as condições térmicas são mais favoráveis devem ocorrer, provavelmente, picos de emergência bastante próximos entre si, ocasionando curtas explosões populacionais (Trivinho-Strixino & Strixino, 1982).

A temperatura e alimentação influenciam também a maturidade, fecundidade e sobrevivência de *C. sancticaroli*. Nas fêmeas adultas o tempo necessário para o amadurecimento do ovócito é de aproximadamente 33 horas após a emergência, entre 22 e 25° C e 72 horas entre 15 e 18° C. Dependendo das condições tróficas em que as larvas são expostas a fecundidade dos adultos oscila, quanto mais alimentação maior a fecundidade (Trivinho-Strixino & Strixino, 1989).

C. sancticaroli possui registros de distribuição apenas para Argentina e Brasil. No Brasil já foi utilizada como bioindicadora em estudos toxicológicos para avaliar a qualidade de sedimentos provenientes de ambientes aquáticos (Fonseca, 1997; Dornfeld, 2006; Printes *et al.*, 2007 e Printes *et al.*, 2011).

3.3 ECOTOXICOLOGIA

A ecotoxicologia é a caracterização, o entendimento e prognóstico dos efeitos deletérios de produtos químicos ou misturas de substâncias de origem antropogênica. Assim, a ecotoxicologia é o estudo dos efeitos tóxicos de substâncias químicas e efluentes industriais em uma população, na comunidade e também no ecossistema, bem como das medidas necessárias para prever, conter ou tratar os danos causados (Guaratini *et al.*, 2008).

3.3.1 Ensaios de toxicidade

A toxicidade de compostos químicos no meio hídrico é avaliada através de ensaios com organismos representativos da coluna d'água ou dos sedimentos de ambientes de água doce, estuarina ou marinha (Aragão & Araújo, 2008). O princípio fundamental nos quais todos os testes de toxicidade são baseados é o reconhecimento de que a resposta de um organismo na presença de um agente tóxico é dependente da dose ao qual o indivíduo foi exposto (Adams & Rowland 2003).

Segundo Aragón & Araújo (2008), os ensaios de toxicidade podem ser utilizados em diversas situações e para se atingir objetivos distintos (Quadro 3).

QUADRO 3: Aplicabilidade dos testes de toxicidade segundo Aragón & Araújo (2008):

- determinar a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos, dentre outros;
- estabelecer critérios e padrões de qualidade das águas;
- estabelecer limites máximos de lançamento de efluentes líquidos em corpos hídricos;
- avaliar a necessidade de tratamento de efluentes líquidos quanto às exigências de controle ambiental;
- avaliar a qualidade das águas;
- avaliar a toxicidade relativa de diferentes substâncias;
- avaliar a sensibilidade relativa de organismos aquáticos;
- subsidiar programas de monitoramento ambiental;
- estimar os impactos provocados em acidentes ambientais.

3.3.1.1 Ensaios de toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda avalia os efeitos severos e rápidos sofridos pelos organismos expostos a uma substância química em um curto período de tempo, geralmente de um a quatro dias. Os critérios de avaliação são usualmente a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste, pois são facilmente determinados e têm significado biológico e ecológico para o ambiente (Aragão & Araújo, 2008).

Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiro a serem desenvolvidos, portanto, são considerados a base de dados ecotoxicológicos (Birge *et al.*, 1985).

3.3.1.2 Ensaios de toxicidade crônica

Testes de toxicidade crônica avaliam efeitos causados nos organismos expostos a doses sub-letais, as quais geralmente não causam a mortalidade dos indivíduos, mas podem gerar distúrbios fisiológicos e/ou comportamentais em longo prazo. Estes efeitos não são detectáveis em testes de toxicidade aguda, sendo necessário o uso do teste de toxicidade crônica, o qual permite avaliar os efeitos adversos mais sutis aos organismos expostos. Estes testes são mais complexos e sofisticados, pois envolvem a exposição parcial ou total do ciclo de vida dos organismos-teste (Aragão & Araújo, 2008).

3.3.2 Biomarcadores

O meio ambiente é constantemente sobrecarregado com produtos químicos exógenos provenientes das atividades industriais e comunidades urbanas. Entretanto, a presença desses compostos nos ecossistemas por si só não indica efeitos prejudiciais. Conexões devem ser estabelecidas entre os níveis externos de exposição, níveis internos de contaminação dos tecidos e efeitos adversos prévios (Van der Oost *et al.*, 2003).

Biomarcadores são alterações induzidas por xenobióticos em componentes celulares, bioquímicos, processos, estruturas ou funções que são mensuráveis em um sistema biológico (Huggett *et al.*, 1992). A sua utilização é baseada na suposição de que baixas concentrações de substâncias tóxicas irão causar respostas celulares

no organismo antes que efeitos prejudiciais sejam observados nos níveis mais altos de organização biológica (populações e ecossistemas) (Domingues *et al.*, 2010).

O uso de biomarcadores tem um grande potencial para complementar os métodos atuais usados para se determinar a presença e o impacto de poluentes ambientais, já que as análises químicas são caras e, portanto aplicadas somente em uma pequena porcentagem de ambientes (Rojas-García *et al.*, 2011).

Os biomarcadores podem ser classificados como (WHO, 1993):

- Biomarcadores de exposição: referentes a quaisquer alterações biológicas que detectam e quantificam a substância exógena, seus metabólitos e os produtos da interação do xenobiótico com o organismo;
- Biomarcadores de efeito: são aqueles que mostram o efeito tóxico associado a exposição do organismo ao poluente;
- Biomarcadores de suscetibilidade: aqueles que indicam uma habilidade adquirida ou inerente do organismo a responder à exposição a determinado xenobiótico de modo que alterem a suscetibilidade do organismo a uma dada exposição.

Dentre as respostas biológicas que são comumente avaliadas como biomarcadores estão às respostas bioquímicas, as quais incluem quantificações das atividades de várias enzimas (Huggett *et al.*, 1992).

3.3.2.1 Esterases

A família das Esterases foi classificada por Aldridge (1953) em três tipos (A, B e C), os quais possuem comportamentos diferenciados frente aos compostos organofosforados (Laguerre *et al.*, 2009):

- TIPO A – Carboxilesterases: são enzimas capazes de hidrolisar os compostos organofosforados, como por exemplo, Esterase alfa (EST - α) e Esterase beta (EST - β).
- TIPO B – Colinesterases: são inibidas por compostos organofosforados. Têm a função de hidrolisar ésteres carboxílicos e são divididas em dois grupos:
 - Acetilcolinesterases (AChE): extremamente específicas, as quais hidrolisam acetilcolina nas fendas sinápticas.
 - Pseudocolinesterases (PChE): esterases não específicas, as quais hidrolisam um grande número de colinas, por exemplo butirilcolinas.

- TIPO C – não interagem com compostos organofosforados.

3.3.2.1.1 Biomarcadores de neurotoxicidade

3.3.2.1.1.1 Enzima acetilcolinesterase (AChE)

A acetilcolinesterase é uma enzima extremamente importante encontrada nos tecidos nervosos, a qual é altamente específica ao neurotransmissor acetilcolina. A AChE remove o neurotransmissor acetilcolina das fendas sinápticas, portanto regula a transmissão do impulso nervoso (Galloway & Handy, 2003). A inibição da AChE no sistema nervoso resulta na acumulação de acetilcolina em níveis tóxicos. Isso proporciona um maior tempo de permanência do neurotransmissor no seu receptor colinérgico, levando a hiper excitação e morte (Domingues *et al.*, 2010).

Diversos são os registros que indicam os compostos organofosforados como inibidores diretos dessa enzima (Fulton & Key, 2001; Galloway & Handy, 2003; Rakotondravelo *et al.*, 2006; Printes *et al.*, 2011), portanto, a quantificação da atividade enzimática da AChE pode indicar se o organismo foi exposto a um composto organofosforado ou quanto ela será inibida em determinadas concentrações.

3.3.2.1.2 Biomarcadores de biotransformação

Quando o organismo entra em contato com um poluente químico geralmente ocorrem reações enzimáticas de Fase I e II objetivando o metabolismo desses compostos exógenos o mais rápido possível. As reações de Fase I são de oxidação, redução ou hidrólise. Os produtos desses processos são frequentemente mais reativos ou mais tóxicos que os iniciais, porém são mais instáveis e facilmente entram no sistema de Fase II, o qual envolve a conjugação do composto (Van der Oost *et al.*, 2003).

3.3.2.1.2.1 Enzimas esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β)

A classificação das esterases é baseada em suas preferências pelos substratos alfa ou beta naftil, suas mobilidades no gel de poliacrilamida e suas

sequências de nucleotídeos. São consideradas eficientes enzimas da Fase I do metabolismo que se ligam ao inseticida, transformando-os, dessa forma elas sequestram as substâncias exógenas rapidamente e vão metabolizando-as lentamente. Por este motivo estão envolvidas com a resistência metabólica principalmente de compostos organofosforados (Hemingway & Ranson, 2000).

3.3.3 Parâmetro fecundidade

A ação do ambiente modificando a sobrevivência e a reprodução dos animais reflete-se nas taxas de mortalidade e de natalidade da população. A taxa de natalidade está intimamente relacionada com a fecundidade e a sobrevivência, pois é através de ambas que podemos determinar o potencial reprodutivo da população (Strixino, 1980).

Fecundidade é a taxa com a qual um organismo produz unidades reprodutoras (óvulos ou espermatozóides) (Allee *et al.*, 1949) e pode ser classificada em três tipos (Trivinho-Strixino & Strixino, 1989):

- Fecundidade Inerente: número máximo de ovos que seriam produzidos por fêmea se não houvesse a ação do ambiente;
- Fecundidade Potencial: número de óvulos maduros presentes nos ovários das fêmeas;
- Fecundidade Realizada: número de ovos efetivamente ovipostos.

Para se quantificar a fecundidade em insetos podem ser utilizados métodos de estimativa diretos, como por exemplo, dissecação de fêmeas grávidas ou métodos de estimativas indiretos através da relação entre tamanho e fecundidade, a qual é estabelecida após uma análise de regressão (Strixino, 1980).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

O material biológico utilizado foi proveniente de uma colônia matriz da espécie *Chironomus sancticaroli* pertencente ao Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária (LEMV) mantida desde fevereiro de 2008 em sala de criação do Programa de Pós-graduação em Entomologia do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (UFPR), sob condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($80 \pm 10\%$) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro).

Espécimes desta colônia foram depositados na Coleção Entomológica Pe. Jesus Santiago Moure do Departamento de Zoologia da Universidade Federal do Paraná (DZUP), números de patrimônio 249269 a 249276.

4.2 CRIAÇÃO DA ESPÉCIE *Chironomus sancticaroli*

A criação da espécie *C. sancticaroli* foi adaptada de Maier *et al.* (1990). Os organismos são mantidos em aquários de vidro: um aquário tipo 1 (dimensões: 60 cm x 40 cm x 35 cm; com capacidade para 85 L) e quatro aquários tipo 2 (dimensões: 25 cm x 15 cm x 25 cm; com capacidade para 10 L) (Figura 4).

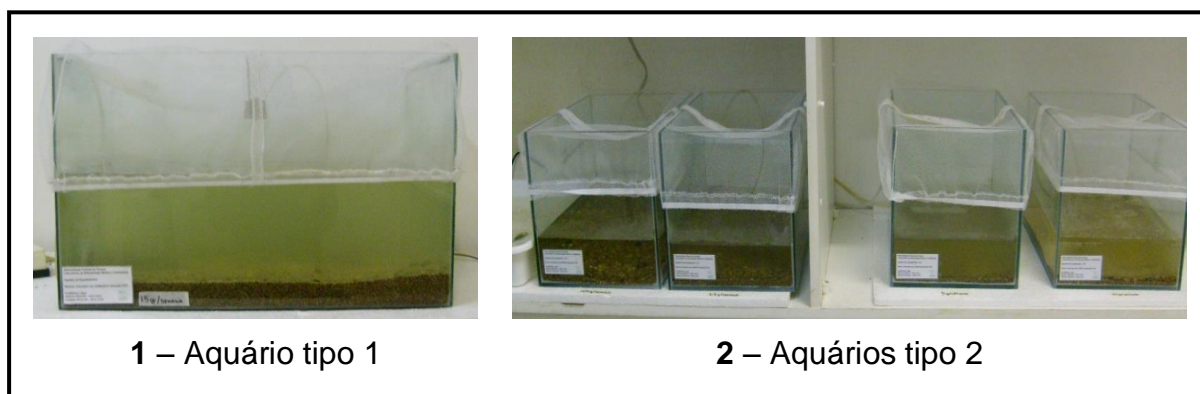


FIGURA 4: Aquários utilizados para a criação da espécie *Chironomus sancticaroli* em sala de criação com condições controladas de temperatura ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($80 \pm 10\%$) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). 1 – Aquário tipo 1 (dimensões: 60 cm x 40 cm x 35 cm; com capacidade para 85 L); 2 – Aquários tipo 2 (dimensões: 25 cm x 15 cm x 25 cm; com capacidade para 10 L).

Os cinco aquários possuem areia como sedimento (3 cm no aquário tipo 1 e 1 cm no aquário tipo 2), água desclorada (50 litros no aquário tipo 1 e 7 litros nos aquários tipo 2) e aeração constante.

Semanalmente é acrescentada ração triturada Dog Chow® (10g para o aquário tipo 1 e 2,86g para os aquários tipo 2) e é realizada a limpeza e troca parcial da água de um dos aquários. Este procedimento segue uma ordem, a qual não é alterada, para que cada aquário seja limpo uma vez por mês, não interferindo assim no ciclo de vida dos organismos.

Os aquários apresentam espaço suficiente para a emergência dos adultos e são cobertos com uma tela de tecido transparente, com um zíper no meio, o qual facilita a alimentação sem que ocorra a fuga dos adultos. Após a cópula as fêmeas ovipositam seus ovos na água do próprio aquário em que emergiram, portanto, nos aquários ocorrem simultaneamente todos os estágios de vida de *C. sancticaroli*: ovos, larvas de I, II, III e IV ínstar, pupas, machos e fêmeas.

Para a realização dos bioensaios, massas ovígeras contendo aproximadamente 800 ovos foram retiradas dessa colônia matriz e individualizadas em bandejas de plástico (dimensões: 38 cm x 24 cm x 8 cm ; com capacidade para 7 L), contendo 0,4g de ração triturada TetraMin®, 4 litros de água desclorada e aeração constante, para o desenvolvimento das larvas, as quais são selecionadas para os testes toxicológicos quando atingem o III ínstar final / IV ínstar inicial (7 dias) (Figura 5).

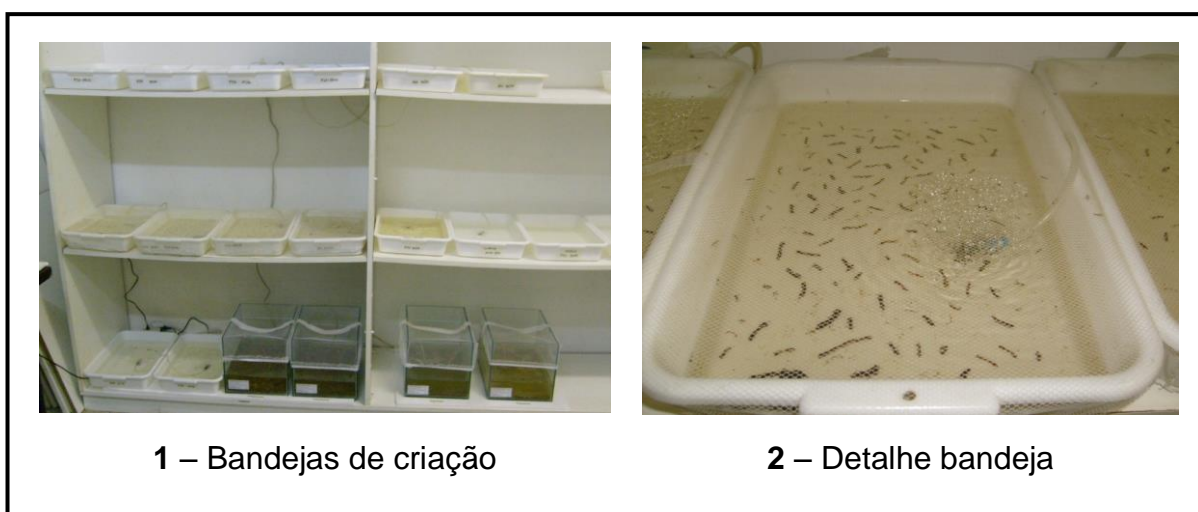


FIGURA 5: Sala de criação com imagens das bandejas utilizadas para a separação das larvas de *Chironomus sancticaroli* para realização dos bioensaios. 1 – Aspecto geral da disposição das bandejas na sala; 2 – Detalhe da bandeja (dimensões: 38 cm x 24 cm x 8 cm; com capacidade para 7 L) contendo larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial e aeração constante.

4.3 AVALIAÇÃO DA POPULAÇÃO DE *Chironomus sancticaroli*

Testes de toxicidade com uma substância referência são aplicados com o objetivo de se obter três informações relevantes: o estado de saúde dos organismos usados nos testes; demonstra se o laboratório pode realizar os procedimentos de ensaio de uma forma reprodutível e se a sensibilidade de uma determinada população em uso no laboratório é comparável a outras populações em outros laboratórios (USEPA, 2000).

Para uma substância ser escolhida como referência alguns critérios devem ser obedecidos (*Environment Canada*, 1990):

- Ser um contaminante ambiental, sendo necessárias informações prévias sobre sua estabilidade, solubilidade, toxicidade e método analítico;
- Ser fácil de analisar quimicamente;
- Estar disponível no mercado com pureza consistente;
- Ser solúvel em água;
- Ser estável em água e que sua toxicidade permaneça inalterada;
- Ter alta toxicidade em águas;
- Ter toxicidade consistente, especialmente dentro de uma faixa de pH;
- Ter toxicidade não variável em função da qualidade da água;
- Ter toxicidade não específica para os diferentes grupos de organismo;
- Ter dados ecotoxicológicos básicos disponíveis.

A substância de referência Cloreto de Potássio (KCl) é comumente utilizada para outras espécies de Chironomidae já padronizadas como organismo-teste por órgãos de defesa ambiental, como por exemplo *Chironomus tentans* (USEPA, 2000). Por este motivo esta substância foi escolhida para ser aplicada nos testes de sensibilidade no presente trabalho.

Foram realizados 10 testes de sensibilidade para avaliação da qualidade da população de *C. sancticaroli*, os quais consistiram em expor os organismos-teste a diferentes concentrações da substância de referência KCl de acordo com o protocolo descrito por Dornfeld (2006).

As concentrações de KCl utilizadas foram 1,5; 2,25; 3,5; 5,0; 7,5 g.L⁻¹ e mais o controle contendo apenas água. Para a realização desses testes utilizou-se 200 ml da solução de KCl, 0,024g de ração TetraMin® apenas no primeiro dia de ensaio e

seis organismos em cada uma das três réplicas realizadas por concentração, totalizando 108 larvas utilizadas por ensaio (Figura 6).

Teste de Sensibilidade da população de <i>Chironomus sancticaroli</i>						
Concentrações de Cloreto de Potássio (KCl)						
[C] (g.L ⁻¹)	Controle	1,5	2,25	3,5	5,0	7,5
Réplica 1	6	6	6	6	6	6
Réplica 2	6	6	6	6	6	6
Réplica 3	6	6	6	6	6	6

FIGURA 6: Representação esquemática dos testes de sensibilidade com a substância de referência cloreto de potássio (KCl) em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial para avaliar a qualidade da população de *Chironomus sancticaroli* mantida em laboratório. Foram utilizadas cinco concentrações mais o controle com água, cada tratamento apresentou três réplicas, cada uma contendo seis larvas da espécie.

Os testes tiveram duração de 96 horas e os resultados foram analisados utilizando o programa Trimmed Spearman-Kärber, com a finalidade de se obter a CL₅₀ para o cloreto de potássio.

Para o estabelecimento da faixa de sensibilidade foi utilizado o modelo proposto pela USEPA (2000), o qual consiste na utilização dos valores médios da CL₅₀ obtidos, mais ou menos dois desvios padrão. Neste modelo, calcula-se a média (X), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação (CV). Com estes dados estabelece-se o limite superior ($X + 2.DP$) e o inferior ($X - 2.DP$). Portanto, os valores da CL₅₀ compreendidos dentro desta faixa são aproveitados, e consequentemente os que estiverem fora serão descartados.

Resultado da avaliação da população de *Chironomus sancticaroli*

Os resultados referentes aos 10 testes de sensibilidade estão apresentados na tabela 1, bem como na figura 7, podendo-se verificar que a faixa de sensibilidade da espécie para o KCl variou de 3,91 a 5,68 g.L⁻¹, com coeficiente de variação (CV) de 9,23%.

TABELA 1: Valores da Concentração Letal ($CL_{50} - 96h$, $g.L^{-1}$) do Cloreto de Potássio (KCl) e dos intervalos de confiança (IC – 95%) de cada teste de sensibilidade com *Chironomus sancticaroli*.

Nº do Teste	Data	$CL_{50} - 96h$	IC (95%)
1	10/12/2010	5,11	4,59 – 5,70
2	13/12/2010	4,03	3,29 – 4,94
3	20/01/2011	4,47	3,55 – 5,62
4	21/01/2011	5,30	4,80 – 5,84
5	25/01/2011	5,54	5,04 – 6,09
6	27/01/2011	4,76	4,15 – 5,45
7	31/01/2011	4,55	3,95 – 5,24
8	11/07/2011	4,90	4,48 – 5,35
9	12/07/2011	4,85	4,16 – 5,66
10	12/07/2011	4,49	3,98 – 5,07
Média (X)		4,80	
Variância (S^2)		0,19	
Desvio Padrão (S)		0,44	
Coef. Variação em % (CV)		9,23	

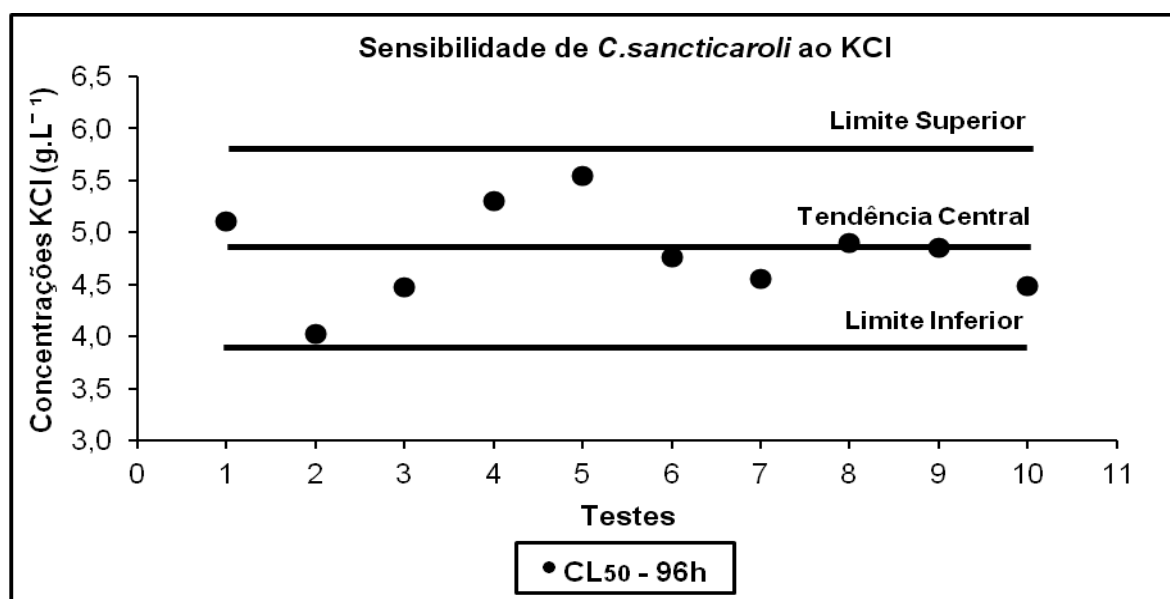


FIGURA 7: Concentrações Letais $CL_{50} - 96h$ ($g.L^{-1}$) para cada um dos 10 testes realizados, bem como o limite superior e inferior da faixa sensibilidade de *Chironomus sancticaroli* ao Cloreto de Potássio (KCl).

Quando a faixa de sensibilidade obtida neste estudo é comparada com a faixa encontrada por Fonseca (1997) para a mesma espécie e substância referência, pode-se observar uma similaridade dos dados, já que o valor médio encontrado pela

autora para a CL_{50} foi de $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ e faixa de sensibilidade de 2,6 a $6,4 \text{ g.L}^{-1}$ (CV= 21%).

A precisão analítica dos testes de toxicidade, dentre eles os testes de sensibilidade, deve ser avaliada utilizando as mesmas condições-teste, organismos e substância referência, sendo que a variabilidade dos testes pode ser analisada através do coeficiente de variação (CV), ou seja:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} . 100$$

onde:

S = desvio padrão

X = média

De forma geral, um método ecotoxicológico é considerado bom quando a variação dos resultados, expressa pelo CV, for \leq a 30% (*Environment Canada*, 1990). No presente trabalho o coeficiente de variação obtido foi de 9,23%, portanto, este valor indica que a manutenção da espécie foi realizada em condições uniformes, bem como houve pouca variabilidade nas respostas entre os organismos.

A partir destes resultados pode-se dizer que a população de *C. sancticaroli* mantida no Laboratório de Entomologia Médica e Veterinária pode ser utilizada como organismo teste em bioensaios de toxicidade.

4.4 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE AGUDA

4.4.1 Determinação das concentrações letais

Foram realizados bioensaios de toxicidade aguda com imaturos de *C. sancticaroli* (III ínstar final/ IV ínstar inicial), com a finalidade de calcular a faixa de concentrações letais do malathion para a população, isto é, as concentrações do contaminante que causam mortalidade de 0 a 99% dos organismos-teste, e também a concentração de efeito não observado (CENO) do malathion. A CENO é calculada dividindo-se o valor encontrado da CL_{50} por 10, considerando-se assim a CENO como uma estimativa da toxicidade crônica (Adams & Rowland, 2003):

$$\text{CENO} = \frac{\text{Valor CL}_{50}}{10}$$

Para o desenvolvimento dos testes foi utilizado o reagente Malathion Pestanal – 96,1%, 36143 da marca Sigma-Aldrich. Os bioensaios foram realizados em frascos de vidro com capacidade de 300 ml, nos quais foram adicionados 200 ml da solução-teste. Foram utilizadas oito concentrações (0,3; 0,9; 1,5; 2,1; 2,7; 3,3; 3,9; 4,5 $\mu\text{g.L}^{-1}$) do malathion mais o controle contendo apenas álcool absoluto na solução (160 μl). Cada concentração apresentou quatro réplicas, totalizando 36 frascos de vidro, os quais continham 24g de areia como sedimento e dez larvas de *C. sancticaroli*, sendo utilizados 360 organismos por ensaio (Figura 8).

Bioensaios de Toxicidade Aguda - Calibrações									
Concentrações malathion									
[C] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Controle	0,3	0,9	1,5	2,1	2,7	3,3	3,9	4,5
Réplica 1	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Réplica 2	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Réplica 3	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Réplica 4	10	10	10	10	10	10	10	10	10

FIGURA 8: Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade aguda com o composto malathion em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial de *Chironomus sancticaroli* para as calibrações das concentrações letais (CLs). Foram utilizadas oito concentrações mais o controle com álcool, cada tratamento apresentou quatro réplicas, cada uma contendo dez larvas da espécie.

Foram realizados três bioensaios completos em dias diferentes para a calibração das concentrações letais, os quais foram acondicionados em câmara tipo BOD programada para a temperatura de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). Tiveram duração de 96 horas e a leitura foi realizada em bandejas de plástico, nas quais foi colocado o conteúdo de cada frasco para a triagem das larvas.

Os resultados dos três bioensaios foram agrupados para serem analisados através do programa Probit Basic, totalizando 960 larvas analisadas (120 larvas por concentração).

4.4.2 Exposição ao malathion

Foram realizados bioensaios de toxicidade aguda com concentrações sub-letais do inseticida malathion, expondo-se os organismos da espécie *C. sancticaroli* ao composto com a finalidade de se analisar as respostas bioquímicas geradas por essa exposição.

Os bioensaios foram realizados em frascos de vidro com capacidade de 300 ml, nos quais foram adicionados 200 ml da solução-teste. Foram selecionadas cinco concentrações 0,1; 0,25; 1,37; 1,96 e 2,51 $\mu\text{g.L}^{-1}$ do malathion mais o controle contendo apenas álcool absoluto na solução (230 μl). A primeira concentração escolhida representa o valor estabelecido pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) como limite para águas-doces de Classe 1, a segunda é o valor encontrado para a concentração de efeito não observado (CENO) e as outras três representam respectivamente os valores calculados de CL_{10} , CL_{30} e CL_{50} para a espécie (Figura 9).

Foram realizadas cinco réplicas das duas primeiras concentrações e oito réplicas das três últimas concentrações, totalizando 39 frascos de vidro, os quais continham 24g de areia como sedimento e dez larvas de *C. sancticaroli* do III instar fina/IV instar inicial, sendo utilizadas 390 larvas por ensaio. Essa divergência no número de réplicas foi intencional, pois apenas larvas vivas poderiam ser retiradas destes testes para posteriormente serem analisadas as enzimas, portanto, um maior número de larvas foi exposto nas concentrações mais altas.

Cinco bioensaios completos foram realizados, os quais foram acondicionados em câmara tipo BOD programada com a temperatura de 25°C (\pm 2°C) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro). Tiveram duração de 96 horas e a leitura foi realizada em bandejas de plástico, nas quais foi colocado o conteúdo de cada frasco para a triagem dos organismos. Somente as larvas consideradas vivas foram individualizadas em tubos tipo Eppendorfs de 1,5 ml devidamente identificados com a concentração a qual foram expostas e imediatamente congeladas em freezer - 20°C e estocadas em freezer -80°C para posterior análise enzimática.

Bioensaios de Toxicidade Aguda						
Concentrações malathion	CONAM	CENO	CL ₁₀	CL ₃₀	CL ₅₀	
[C] ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Controle	0,1	0,25	1,37	1,96	2,51
Réplica 1	10	10	10	10	10	10
Réplica 2	10	10	10	10	10	10
Réplica 3	10	10	10	10	10	10
Réplica 4	10	10	10	10	10	10
Réplica 5	10	10	10	10	10	10
Réplica 6				10	10	10
Réplica 7				10	10	10
Réplica 8				10	10	10

FIGURA 9: Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade aguda com cinco concentrações (0,1; 0,25; 1,37; 1,96 e 2,51 $\mu\text{g.L}^{-1}$) do composto malathion mais o controle contendo álcool, em larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial de *Chironomus sancticaroli*, para posterior análise enzimática.

4.5 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE CRÔNICA

Os bioensaios de toxicidade crônica foram realizados com o objetivo de se avaliar os efeitos toxicológicos causados pelo inseticida malathion na população de *C. sancticaroli*, ou seja, se a exposição a tal composto poderia interferir na reprodução dos adultos e interferir na existência e continuidade da espécie. Para isso o parâmetro analisado foi a fecundidade potencial das fêmeas.

Os testes foram realizados em aquários de vidro (dimensões 30 cm X 20 cm X 10 cm; com capacidade para 6 L). Todos os aquários contiveram 375g de areia como sedimento (1,5 cm) e um volume final de solução de 3 litros. A cada dois dias foram acrescentados 0,2g de ração triturada TetraMin® e semanalmente a solução foi trocada por uma nova para que não ocorresse diminuição da concentração de exposição devido a degradação do produto.

Os organismos foram expostos desde a fase de ovo a duas concentrações subletais (0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ - CONAMA e 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$ - CENO) do malathion, cada uma com

duas réplicas, totalizando quatro aquários com o contaminante e dois controles com álcool absoluto (Figura 10).

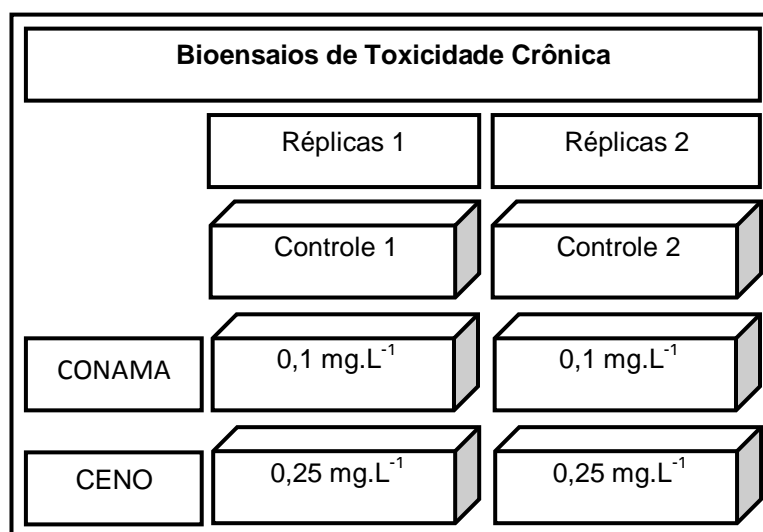


FIGURA 10: Representação esquemática dos bioensaios de toxicidade crônica com duas concentrações (0,1 e 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$) do composto malathion mais o controle contendo álcool, durante o ciclo de vida inteiro de *Chironomus sancticaroli*.

Foram expostas no total 12 massas ovígeras, sendo que seis delas foram distribuídas entre as réplicas 1 e as outras seis entre as réplicas 2. A distribuição se deu da seguinte forma: cada massa ovígera foi dividida em três partes com o auxílio de um bisturi sob estereomicroscópio, cada parte foi exposta a uma das três condições diferentes do ensaio (controle, concentração 1 e 2). Esse procedimento foi realizado com as 12 massas ovígeras, totalizando seis fragmentos de massas ovígeras em cada aquário, o que seria equivalente a duas massas inteiras (Figura 11). Dessa forma, todas as concentrações (réplicas 1) contiveram organismos provenientes das mesmas massas ovígeras, assim como as concentrações (réplicas 2), buscando com este procedimento a homogeneidade do ensaio.

Todos os aquários foram cobertos com uma tela de tecido transparente para que fosse possível a emergência dos adultos, sem possibilidade de fuga. Os seis aquários tiveram aeração constante e foram acondicionados em câmara tipo BOD programada para a temperatura 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12h claro / 12h escuro).

Foram realizados dois bioensaios completos, que tiveram a duração de 17 dias. No sexto dia de ensaio foram retiradas 75 larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial de cada aquário para posterior avaliação enzimática, estas foram individualizadas em tubos tipo Eppendorfs de 1,5 ml devidamente identificados com

a concentração a qual foram expostas e imediatamente congeladas em freezer -20°C e estocadas em freezer -80°C.

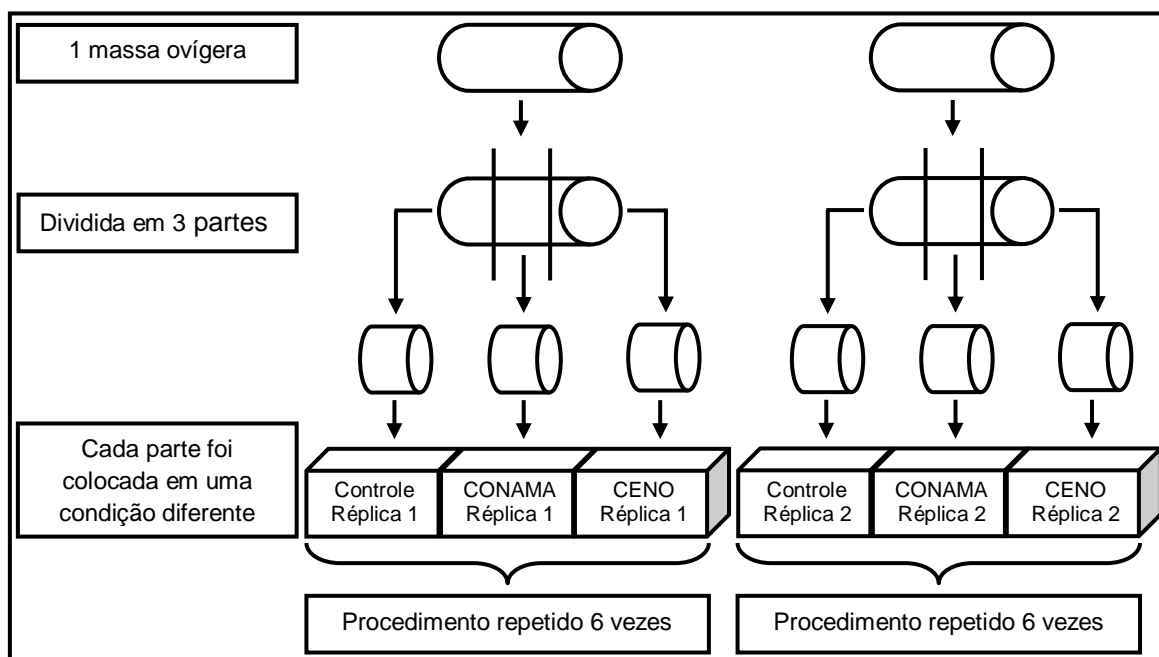


FIGURA 11: Representação esquemática da distribuição das massas ovígeras no bioensaio de toxicidade crônica de *Chironomus sancticaroli*.

4.6 EFEITOS POPULACIONAIS

4.6.1 Adultos de *Chironomus sancticaroli*

Os adultos provenientes dos bioensaios de toxicidade crônica começaram a emergir a partir do 8º dia de ensaio. Foram diariamente contabilizados e separados em machos e fêmeas, os machos foram descartados e as fêmeas foram armazenadas em álcool 70% para posterior análise de fecundidade. Este procedimento ocorreu durante 10 dias. A proporção entre machos e fêmeas foi comparada entre os tratamentos e analisada através do teste de qui-quadrado (χ^2).

4.6.2 Fecundidade potencial

A avaliação da taxa de fecundidade potencial foi realizada segundo o descrito por Trivinho-Strixino & Strixino (1989), através da medida do comprimento da asa, efetuada com auxílio da lupa SteREO Discovery V.20 com câmara embutida (Figura 12). A asa foi medida a partir da alula com o auxílio do programa AxioVision

(Figura 12), tendo sido desprezada a base verdadeira, uma vez que esta pode quebrar-se ao ser destacada do tórax da fêmea.

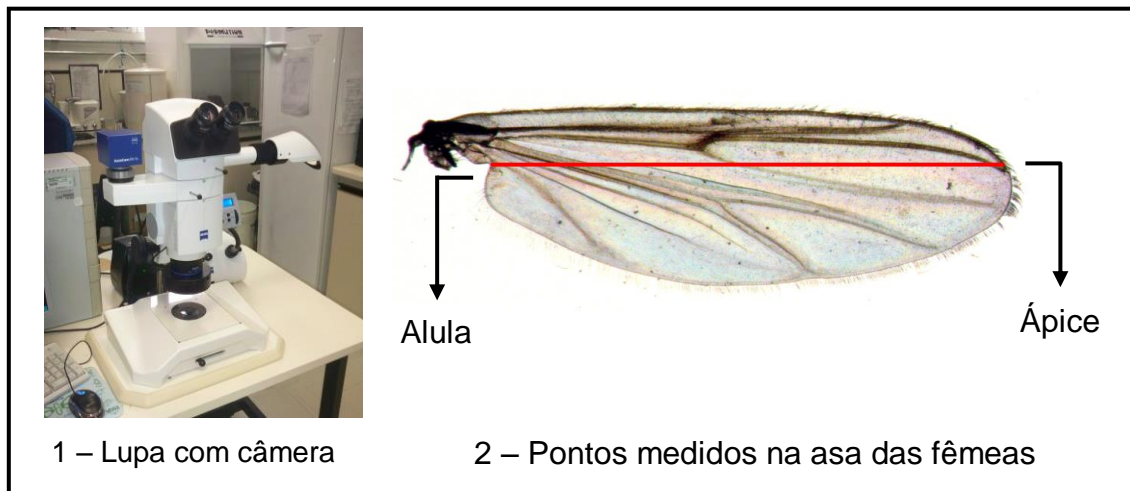


FIGURA 12: Método empregado para se obter o comprimento das asas das fêmeas de *Chironomus sancticaroli*. 1 – Lupa SteREO Discovery V.20 com câmera Zeiss utilizada para tirar as fotos das asas das fêmeas; 2 – Asa da fêmea indicando os pontos utilizados para a medida de comprimento (Alula – ápice da asa).

Foram mensuradas apenas as asas localizadas no lado direito das fêmeas com o objetivo de se estabelecer um padrão.

Para se estimar a fecundidade potencial a partir do comprimento da asa, foi aplicada a seguinte fórmula já determinada anteriormente por Trivinho-Strixino & Strixino (1989) para *C. sancticaroli*:

$$F = (k \times L) - m$$

onde,

F = fecundidade potencial

k = constante já calculada (471,64)

L = comprimento da asa

m = constante já calculada (707,41)

4.7 CALIBRAÇÃO DO PROTOCOLO DOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Com o objetivo de padronizar as condições para o uso da atividade das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST – α) e esterase beta (EST – β) em testes de toxicidade com imaturos de *C. sancticaroli* foi avaliado o efeito de

alguns procedimentos experimentais na atividade das três enzimas. Foram analisados quatro fatores que podem ser divididos em dois grupos:

- Fatores inerentes à preparação e conservação das amostras: efeito da centrifugação e do congelamento das amostras;
- Fatores relacionados com o estado nutricional e fisiológico dos organismos: efeito da temperatura de criação e do jejum das larvas.

4.7.1 Efeito da centrifugação das amostras

Para avaliar os efeitos causados pela centrifugação das amostras na atividade das enzimas (AChE, EST – α e EST – β) em *C. sancticaroli* foram utilizadas 90 larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial (30 larvas para cada enzima testada). As larvas foram preparadas normalmente (ver seção 4.8.1), porém o volume da amostra foi dividido em duas alíquotas para que uma fosse submetida à centrifugação e a outra não. O protocolo para a quantificação de cada enzima foi realizado sem nenhuma alteração (ver seções 4.8.2; 4.8.3 e 4.8.4).

4.7.2 Efeito do congelamento das amostras

Para avaliar os efeitos causados pelo congelamento das amostras na atividade das enzimas (AChE, EST – α e EST – β) em *C. sancticaroli* foram utilizadas 90 larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial (30 larvas para cada enzima testada). As larvas foram preparadas normalmente (ver seção 4.8.1), porém o volume da amostra foi dividido em duas alíquotas para que uma fosse submetida à quantificação imediata enquanto que a outra alíquota foi congelada em freezer – 80°C por 30 dias. O protocolo para a quantificação de cada enzima foi realizado sem nenhuma alteração (ver seções 4.8.2; 4.8.3 e 4.8.4).

4.7.3 Efeito da temperatura de criação das larvas

Para avaliar os efeitos causados por diferentes temperaturas de criação das larvas de *C. sancticaroli* na atividade das enzimas (AChE, EST – α e EST – β) foram utilizadas 270 larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial (90 larvas para cada enzima testada, sendo 30 larvas para cada temperatura). As larvas foram mantidas desde a

eclosão dos ovos em três temperaturas diferentes: 20°C, 25°C e 30°C em câmara do tipo BOD e foram submetidas ao protocolo de quantificação enzimática (ver seção 4.8).

4.7.4 Efeito do jejum nas larvas

Para avaliar os efeitos causados pelo jejum das larvas de *C. sancticaroli* na atividade das enzimas (AChE, EST – α e EST – β) foram utilizadas 540 larvas de III ínstar final / IV ínstar inicial (180 larvas para cada enzima, sendo 30 larvas para cada condição testada). As larvas foram submetidas a seis condições diferentes:

- Condição A: larvas alimentadas com 0,004g de ração por 24h;
- Condição B: larvas alimentadas com 0,004g de ração por 48h;
- Condição C: larvas alimentadas com 0,004g de ração por 72h;
- Condição D: larvas sem alimento por 24h;
- Condição E: larvas sem alimento por 48h;
- Condição F: larvas sem alimento por 72h.

Esse experimento foi realizado em recipientes de plástico contendo 80 ml de água desclorada. As larvas foram individualizadas para evitar o comportamento de predação existente entre as larvas da espécie (Figura 13).

O experimento foi realizado em câmara tipo BOD programada para a temperatura de 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12h claro/12h escuro). As larvas foram submetidas ao protocolo normal de quantificação enzimática (ver seção 4.8).

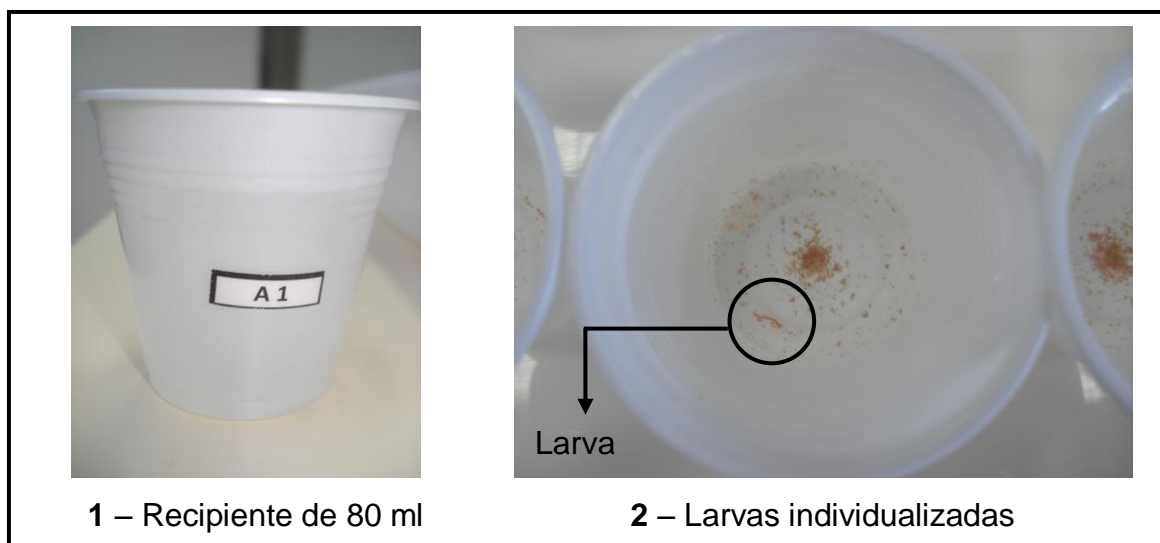


FIGURA 13: Experimento do efeito do jejum das larvas de *Chironomus sancticaroli*. 1 - Detalhe do recipiente utilizado no experimento; 2 – Aspecto geral do interior do recipiente com indicação da única larva utilizada.

4.8 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

4.8.1 Preparação das larvas para os ensaios enzimáticos

4.8.1.1 Congelamento

As larvas provenientes dos bioensaio de toxicidade aguda e crônica foram colocadas, ainda vivas, em tubos tipo Eppendorf. Estas foram congeladas imediatamente em freezer -20°C e estocadas em freezer -80°C. No momento da utilização, os tubos foram retirados do congelador para o processamento imediatamente antes do uso e foram colocados no gelo para descongelarem lentamente.

4.8.1.2 Homogeneização e centrifugação

Para a homogeneização do material, as larvas foram distribuídas individualmente em tubos tipo Eppendorf numerados, foi acrescentado 300µl de solução tampão fosfato de potássio 0,1M pH 7,5 para a enzima AChE e 150µl de solução tampão fosfato de sódio 0,2M pH 7,2 para as enzimas EST- α e EST- β . As larvas foram então homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador automático. Em seguida foram centrifugadas a 12000 x g por 1 minuto a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novos tubos.

4.8.2 Enzima acetilcolinesterase (AChE)

Uma alíquota de 25µl da amostra foi pipetada em quatro réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato) seguidos pela adição de 200µl de DTNB (5,5-Ditio-bis-2nitro-benzoato) e 50µl de ATC (iodeto de acetiltiocolina), foram incubadas por 5 min. O princípio do método é o desenvolvimento da reação colorida que ocorre entre o ATC e o DTNB na presença da AChE (Figura 14).

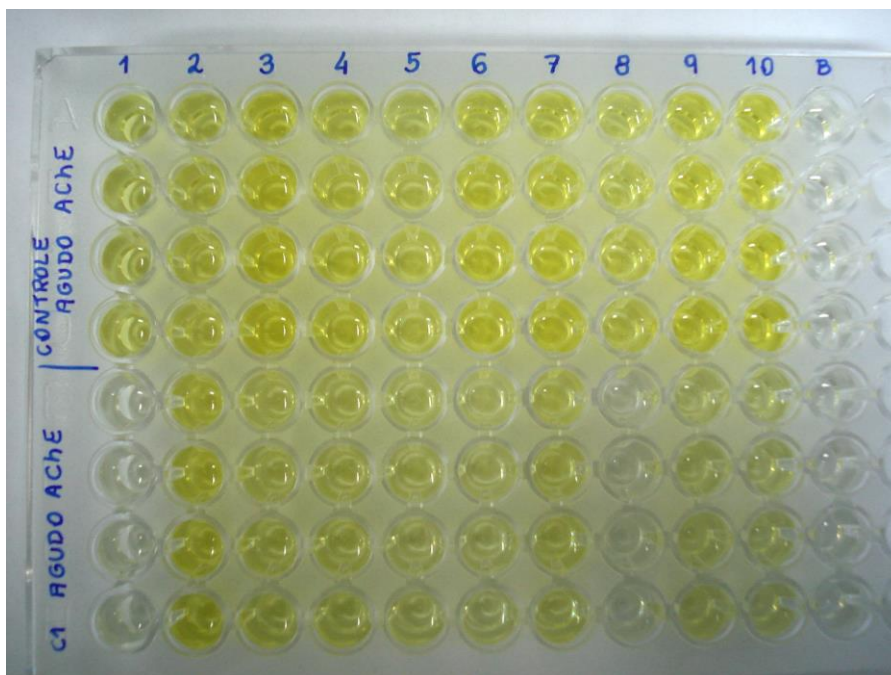


FIGURA 14: Imagem da microplaca do ensaio enzimático com a enzima acetilcolinesterase (AChE) indicando a reação colorida gerada no experimento. Nesta placa cada número representa um indivíduo testado, com suas respectivas quatro réplicas uma embaixo da outra. Foi realizado ensaio com dez organismos na metade superior da placa e dez na metade inferior da placa. As quatro réplicas do branco estão representadas pela letra B.

A leitura foi feita em espectrofotômetro de microplaca BioTek com comprimento de onda de 405nm de acordo com o método de Ellman *et al.* (1961) modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Os resultados foram expressos em mmol/ μ g proteína/min.

4.8.3 Enzima esterase alfa (EST - α)

Uma alíquota de 10 μ l de amostra foi pipetada em quatro réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato), seguidos pela adição de 200 μ l de alfa-naftil acetato/Na fosfato. Esperou-se 15 minutos em temperatura ambiente, logo após adicionou-se 50 μ l do corante Fast blue, então foram incubadas por mais cinco minutos e a leitura foi feita a 570 nm em espectrofotômetro de microplaca BioTek. Os resultados foram expressos em nmol/ μ g proteína/min. O método baseia-se no consumo do substrato alfa-naftil pela enzima esterase alfa, transformando-o em alfa-naftol, quando o corante Fast blue é acrescentado a reação

para imediatamente e a quantidade do produto alfa-naftol pode ser medida através da coloração produzida (Valle *et al.*, 2006) (Figura 15).

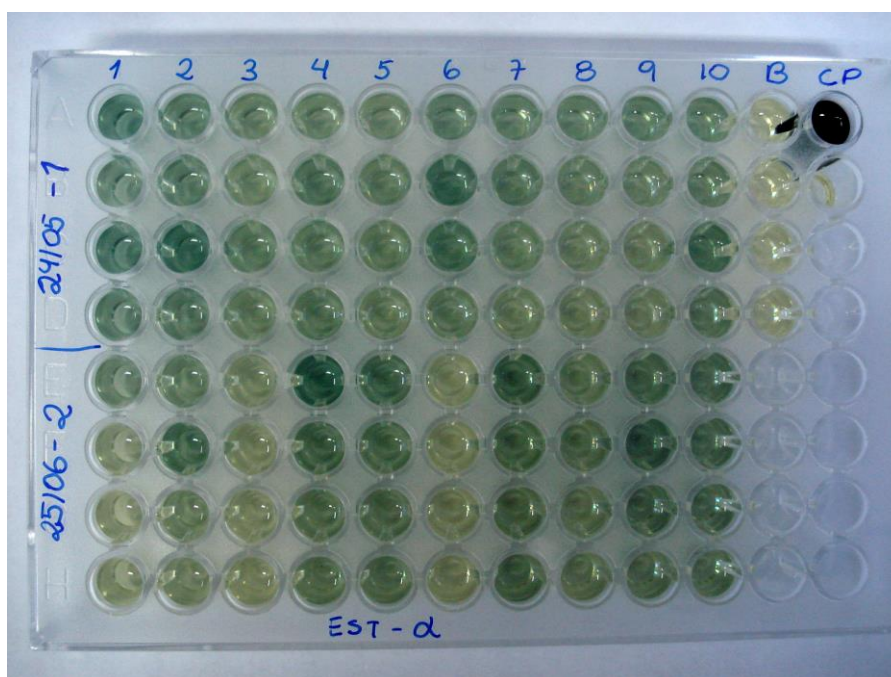


FIGURA 15: Imagem da microplaca do ensaio enzimático com a enzima esterase alfa (EST - α) indicando a reação colorida gerada no experimento. Nesta placa cada número representa um indivíduo testado, com suas respectivas quatro réplicas uma embaixo da outra. Foi realizado ensaio com dez organismos na metade superior da placa e dez na metade inferior da placa. As quatro réplicas do branco estão representadas pela letra B e o controle positivo pelas letras CP.

4.8.4 Enzima esterase beta (EST - β)

Uma alíquota de 10 μ l de amostra foi pipetada em quatro réplicas em microplaca (96 poços, transparente, com fundo chato), seguidos pela adição de 200 μ l de beta-naftil acetato/Na fosfato. Esperou-se 15 minutos em temperatura ambiente, logo após adicionou-se 50 μ l do corante Fast blue, então foram incubas por mais cinco minutos e a leitura foi feita a 570 nm em espectrofotômetro de microplaca BioTek. Os resultados foram expressos em nmol/ μ g proteína/min. O método baseia-se no consumo do substrato beta-naftil pela enzima esterase beta, transformando-o em beta-naftol, quando o corante Fast blue é acrescentado a reação para imediatamente e a quantidade do produto beta-naftol pode ser medida através da coloração produzida (Valle *et al.*, 2006) (Figura 16).

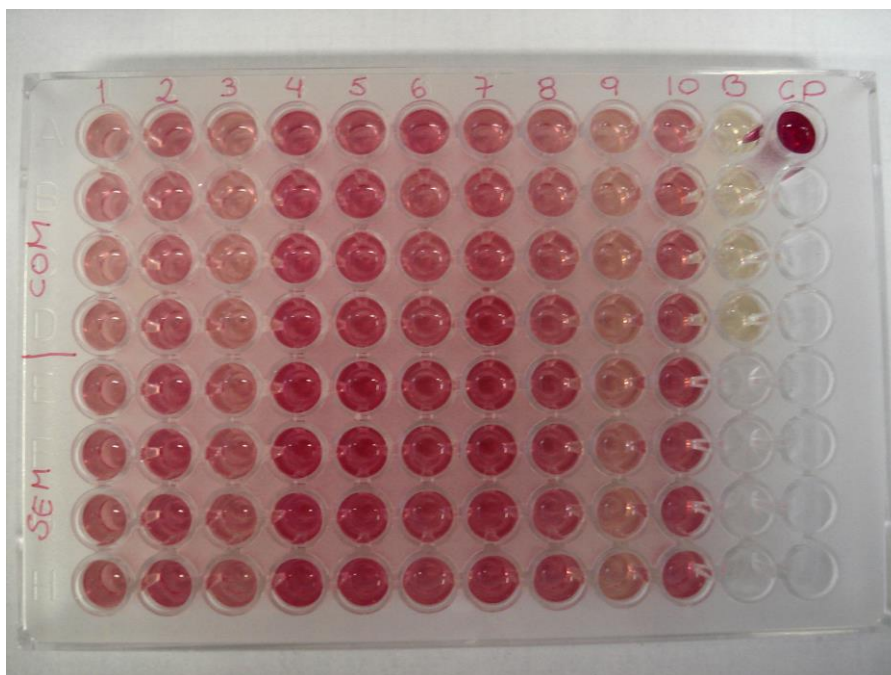


FIGURA 16: Imagem da microplaca do ensaio enzimático com a enzima esterase beta (EST - β) indicando a reação colorida gerada no experimento. Nesta placa cada número representa um indivíduo testado, com suas respectivas quatro réplicas uma embaixo da outra. Foi realizado ensaio com dez organismos na metade superior da placa e dez na metade inferior da placa. As quatro réplicas do branco estão representadas pela letra B e o controle positivo pelas letras CP.

4.8.5 Proteína total (PTN)

A quantidade de proteína total foi mensurada para cada larva de acordo com o método descrito por Bradford (1976), esta quantificação é necessária, pois os resultados de todas as enzimas são normalizados de acordo com a quantidade de proteína totais presente em cada larva testada.

Uma alíquota de 10 μ l de amostra foi pipetada em quatro réplicas em microplaca, seguidos pela adição de 250 μ l do reativo Bradford (Bio-Rad) diluído em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,5 na proporção de 1:5. A leitura foi realizada, três a cinco minutos após a adição do reativo, à 620 nm em espectrofotômetro de microplaca BioTek (Figura 17).

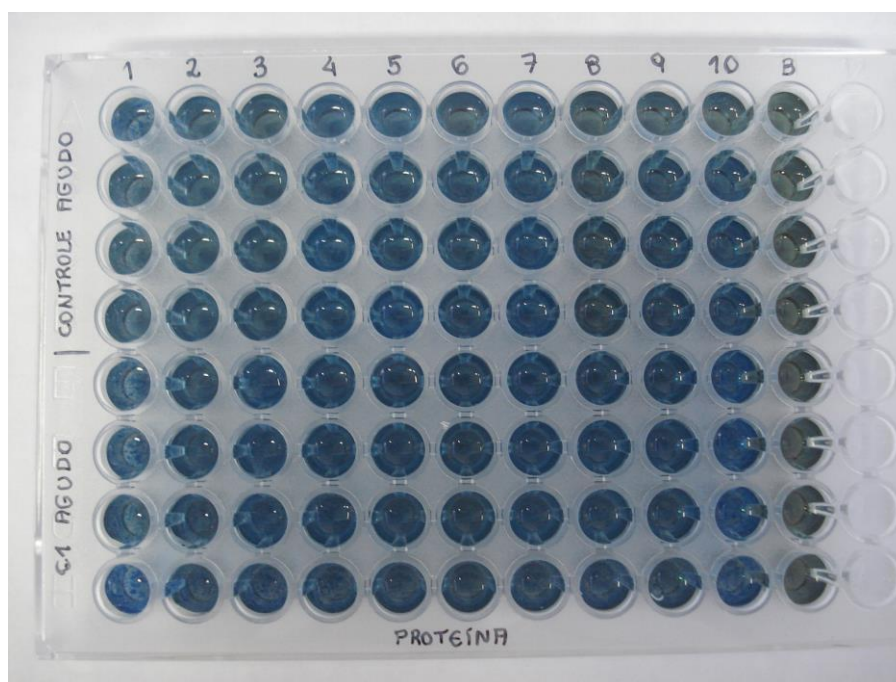


FIGURA 17: Imagem da microplaca do ensaio enzimático para a quantificação da proteína total, indicando a reação colorida gerada no experimento. Nesta placa cada número representa um indivíduo testado, com suas respectivas quatro réplicas uma embaixo da outra. Foi realizado ensaio com dez organismos na metade superior da placa e dez na metade inferior da placa. As réplicas do branco estão representadas pela letra B.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises foram feitas no ambiente R (R Development Core Team 2011). Para avaliar os efeitos das concentrações de malathion (testes agudos e crônicos) na atividade enzimática das enzimas AChE, EST- α e EST- β e na fecundidade das fêmeas foi ajustado um modelo linear generalizado (GLM) utilizando uma distribuição de erro da família Gamma. Para a análise do efeito da temperatura de criação na atividade enzimática das enzimas AChE e EST- β também foi ajustado um modelo linear generalizado (GLM) utilizando uma distribuição de erro da família Gamma, entretanto para a enzima EST- α foi utilizado uma distribuição de erro da família Gaussiana inversa. Foi realizada uma ANOVA - one way e os contrastes de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizados para as comparações *a posteriori*. Para o GLM foram utilizadas as bibliotecas MASS (Venables & Ripley 2002) e effects (Fox 2003) e para a análise *a posteriori* foi utilizada a biblioteca multcomp (Hothorn *et al.* 2008). Para avaliar o efeito da centrifugação e congelamento na atividade enzimática os dados foram logaritmizados e foi utilizado um test t para amostras pareadas, já para

analisar o efeito do jejum na atividade enzimática os dados foram logaritmizados e foi utilizado um test t para amostras não pareadas.

4.10 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

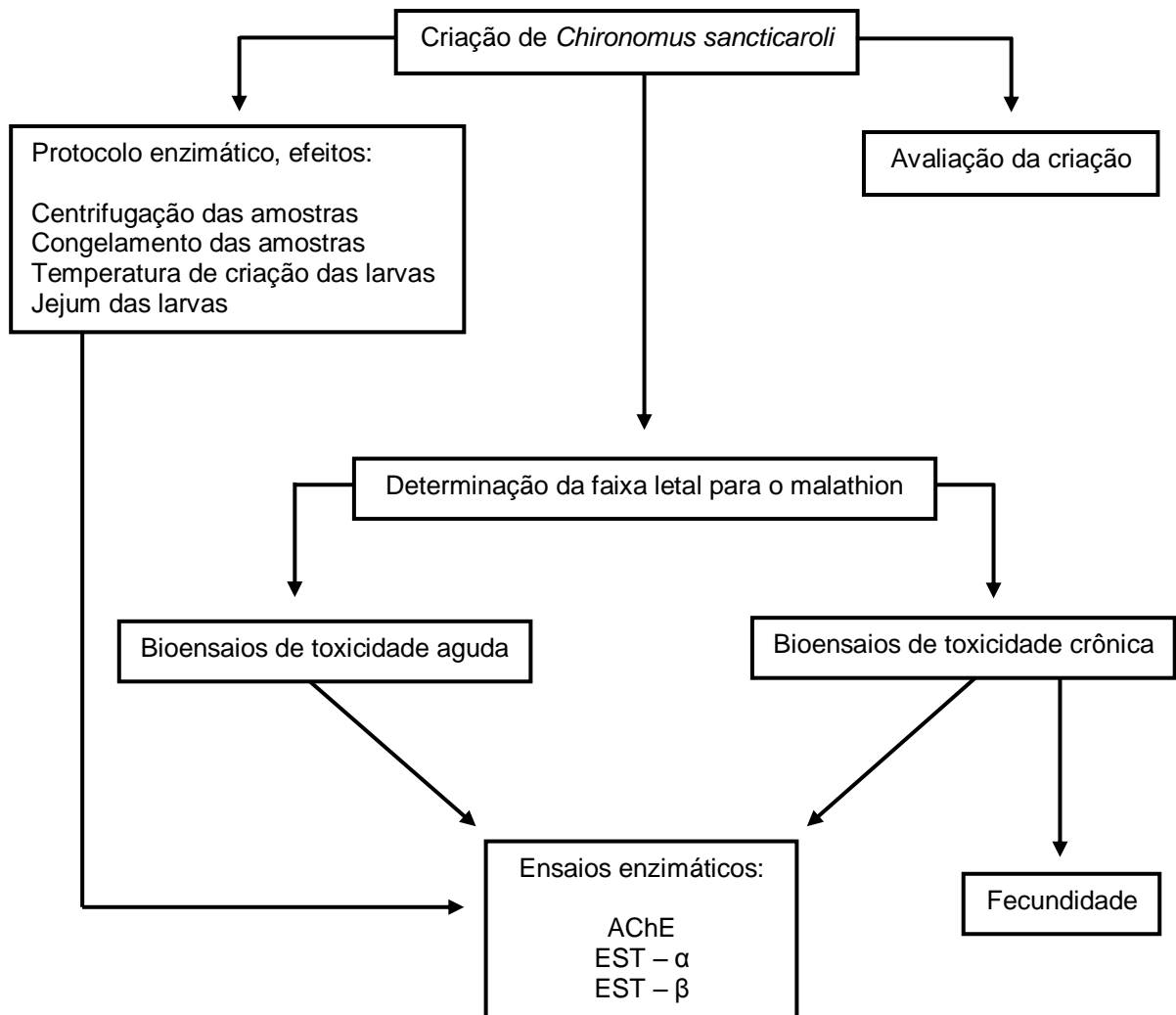


FIGURA 18: Fluxograma indicativo de todas as atividade realizadas.

5 RESULTADOS

5.1 CONCENTRAÇÕES LETAIS

Os resultados, expressos em $\mu\text{g.L}^{-1}$, referentes à faixa letal do malathion para a população de *C. sancticaroli* estão representados na tabela 2, a qual apresenta as concentrações letais com seus respectivos intervalos de confiança. O controle apresentou uma mortalidade de 0% e o χ^2 calculado foi de 5,32, o qual pode atingir um valor de no máximo 10 para maior confiabilidade dos resultados.

TABELA 2: Faixa letal do composto malathion para a espécie *Chironomus sancticaroli* expressa em $\mu\text{g.L}^{-1}$ e seus intervalos de confiança (IC).

Concentrações Letais	Valor ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	IC ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
CL₂	0,95	0,81 – 1,08
CL₁₀	1,37	1,22 – 1,51
CL₃₀	1,96	1,81 – 2,09
CL₅₀	2,51	2,36 – 2,65
CL₇₀	3,21	3,03 – 3,42
CL₉₀	4,59	4,24 – 5,05
CL₉₉	7,51	6,62 – 8,82

Através desses resultados foi possível calcular a concentração de efeito não observado (CENO), a qual apresentou o valor de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$.

A partir da determinação da faixa letal do composto malathion foram selecionadas as concentrações CL₁₀ ($1,37 \mu\text{g.L}^{-1}$), CL₃₀ ($1,96 \mu\text{g.L}^{-1}$) e CL₅₀ ($2,51 \mu\text{g.L}^{-1}$), além do valor máximo permitido pelo CONAMA para rios de classe 1 ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$) e da CENO ($0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) para serem realizados os bioensaios de toxicidade aguda e estas mesmas duas últimas concentrações para os bioensaios de toxicidade crônica.

5.2 ENSAIOS ENZIMÁTICOS

5.2.1 Exposição aguda ao malathion

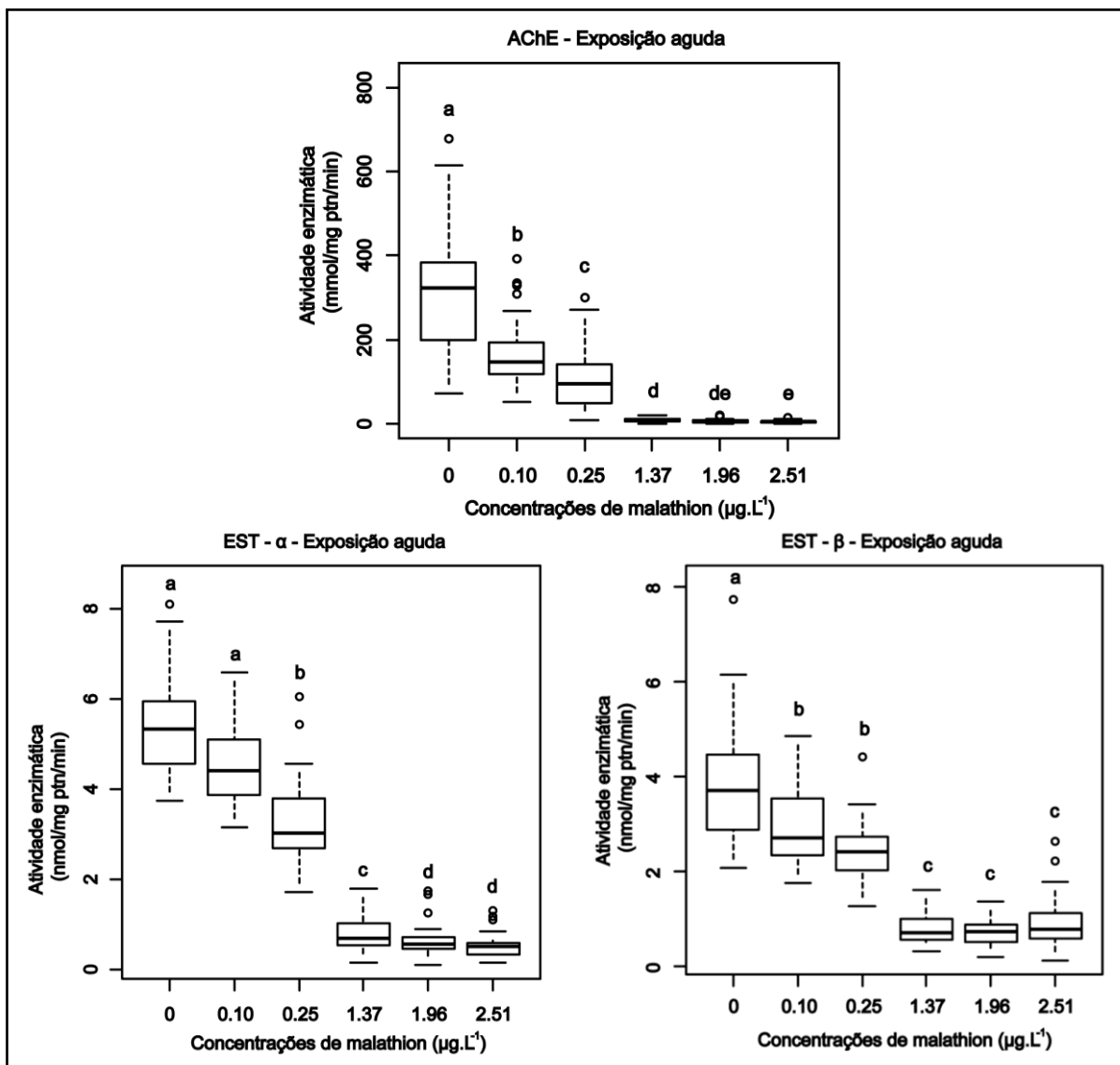


FIGURA 19: Toxicidade aguda (96h) de cinco concentrações do inseticida malathion comparadas com o controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE); esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticaroli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 50$ para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA - one way e os contrastes de Tukey).

Quando comparados ao controle os resultados evidenciam o decréscimo significativo das atividades enzimáticas das enzimas AChE e EST - β a partir da concentração de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e para a enzima EST - α a partir da concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ e esta diminuição é ainda mais acentuada quando são comparados os

resultados da atividade das três enzimas nas concentrações letais CL_{10} (0,00137 $\mu\text{g.L}^{-1}$), CL_{30} (0,00196 $\mu\text{g.L}^{-1}$) e CL_{50} (0,00251 $\mu\text{g.L}^{-1}$) (Figura 19).

5.2.2 Exposição crônica ao malathion

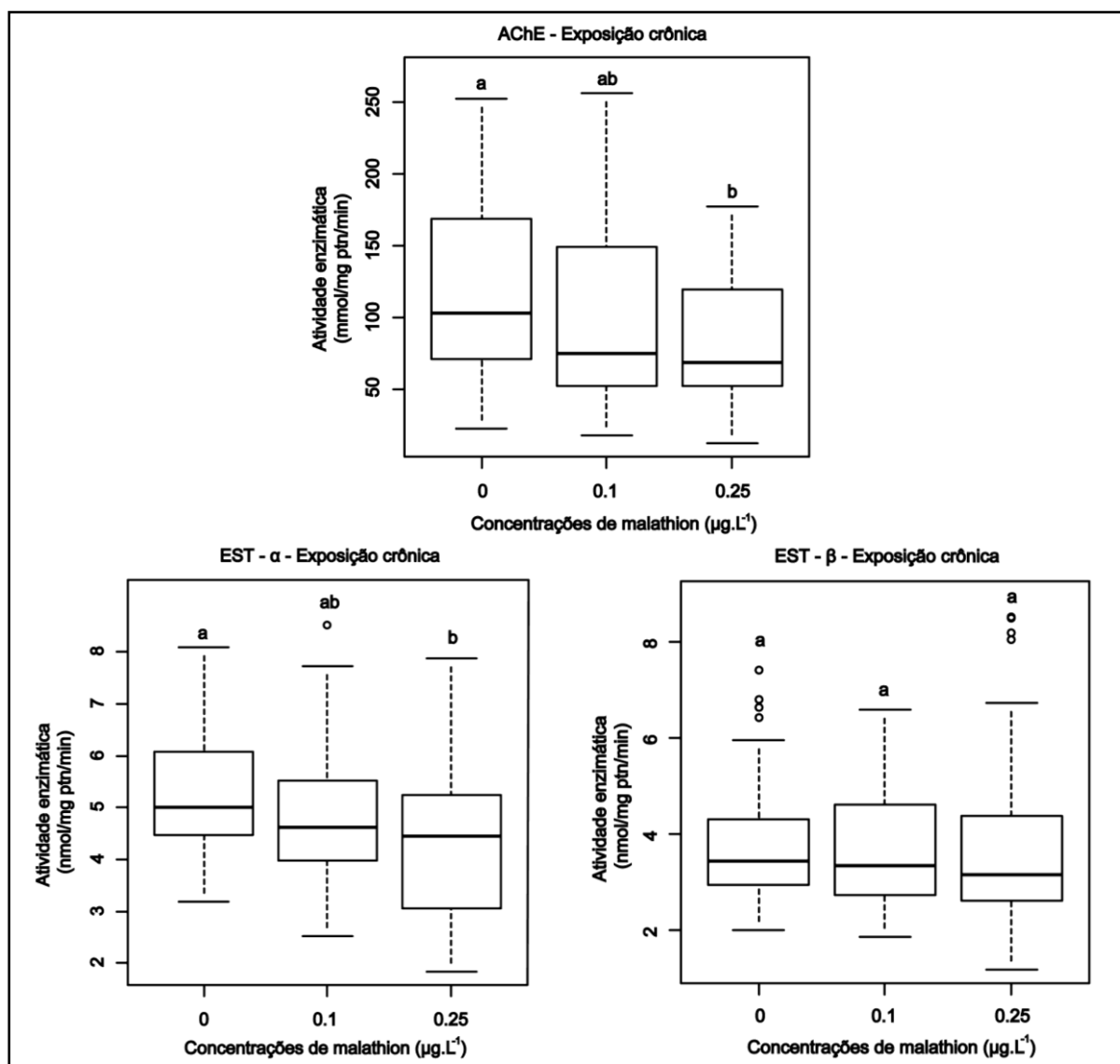


FIGURA 20: Toxicidade crônica de duas concentrações do inseticida malathion comparadas ao controle através da atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticarioli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 50$ para cada grupo). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA - one way e os contrastes de Tukey).

Os resultados indicam que quando os imaturos de *C. sancticarioli* são expostos cronicamente ao inseticida malathion na concentração de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ ocorre uma diminuição na atividade enzimática das enzimas AChE e EST - α , porém este decréscimo não é significativo quando comparado ao controle. Quando são

comparados os resultados do controle frente à concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) pode-se observar uma diminuição significativa da atividade enzimática dessas mesmas duas enzimas. A enzima EST – β não apresentou alterações em sua atividade em nenhuma das concentrações testadas (Figura 20).

5.3 EFEITOS POPULACIONAIS

5.3.1 Adultos de *Chironomus sancticaroli*

O número total de adultos emergentes dos dois bioensaios de toxicidade crônica com as concentrações $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ do inseticida malathion apresentou homogeneidade (tabela 3). Não foram observadas diferenças significativas entre a proporção de machos e fêmeas quando comparados os dois tratamentos com os controles (nível de significância 99%, $p < 0,0001$). Portanto, o inseticida não afetou a proporção sexual nos adultos.

TABELA 3: Número total de machos e fêmeas de *Chironomus sancticaroli* provenientes dos dois bioensaios de toxicidade crônica realizados com duas concentrações $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ do inseticida malathion.

	Concentrações de malathion		
	Controle	$0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$	$0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$
Machos	499	514	580
Fêmeas	587	547	520
TOTAL	1.086	1.061	1.100

A partir dos resultados referentes aos adultos de *C. sancticaroli* provenientes dos dois bioensaios pode-se observar que ocorreram discrepâncias entre os dois bioensaios quando são verificados os tempos de emergência de machos e fêmeas (Figuras 21 e 22). No primeiro bioensaio machos e fêmeas começaram a emergir juntos tanto no controle quanto nos tratamentos e o número de machos e fêmeas diários apresentou maior variação na concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$. Já no segundo bioensaio os machos emergiram antes que as fêmeas em todos os tratamentos e o número diário de machos e fêmeas apresentou maior variação no controle.

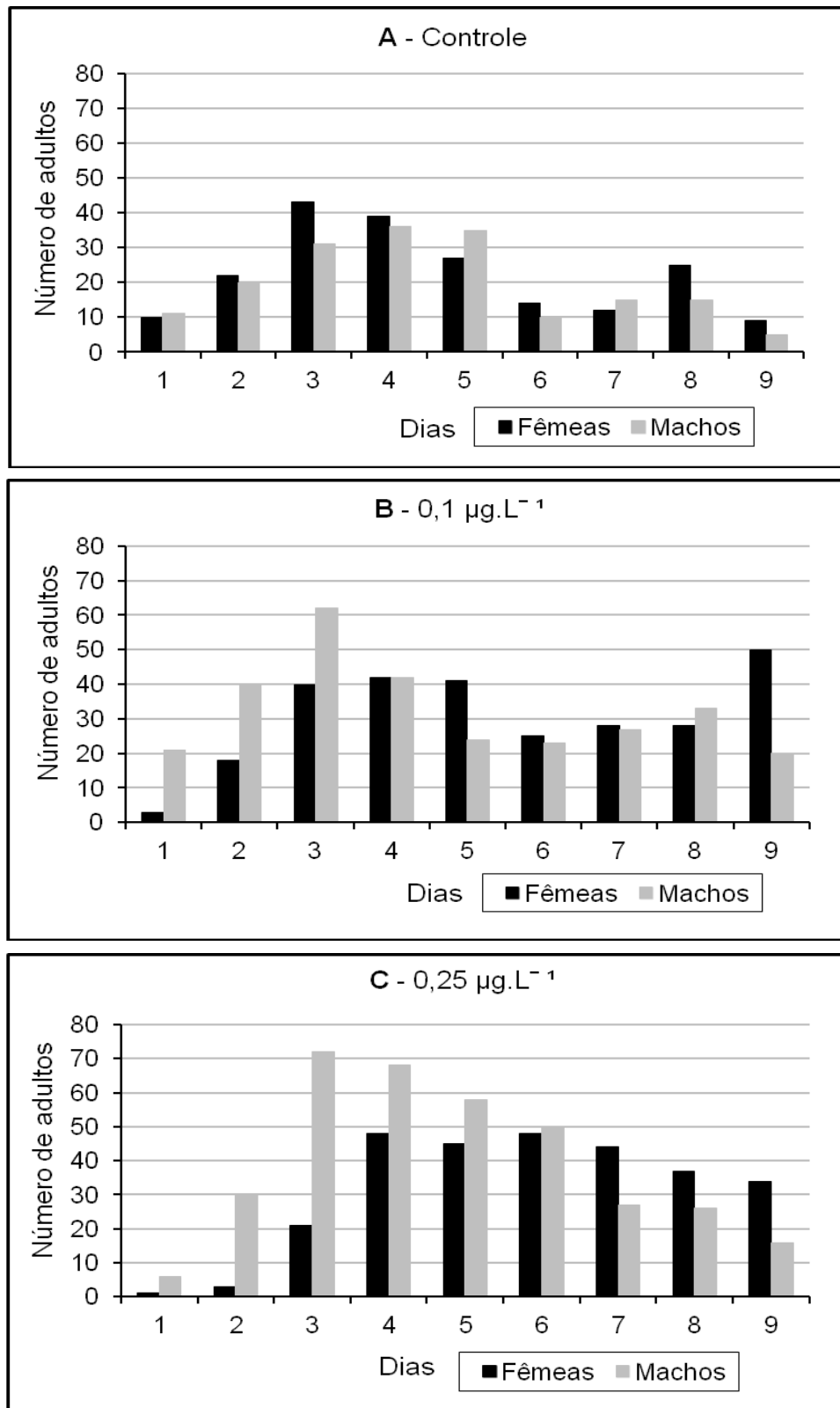


FIGURA 21: Número diário de machos e fêmeas de *Chironomus sancticarioli* provenientes do primeiro bioensaio de toxicidade crônica (17 dias) com duas concentrações do inseticida malathion. A – controle; B – concentração de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$; C – concentração de 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As barras pretas simbolizam o número de machos e as barras cinzas o número de fêmeas.

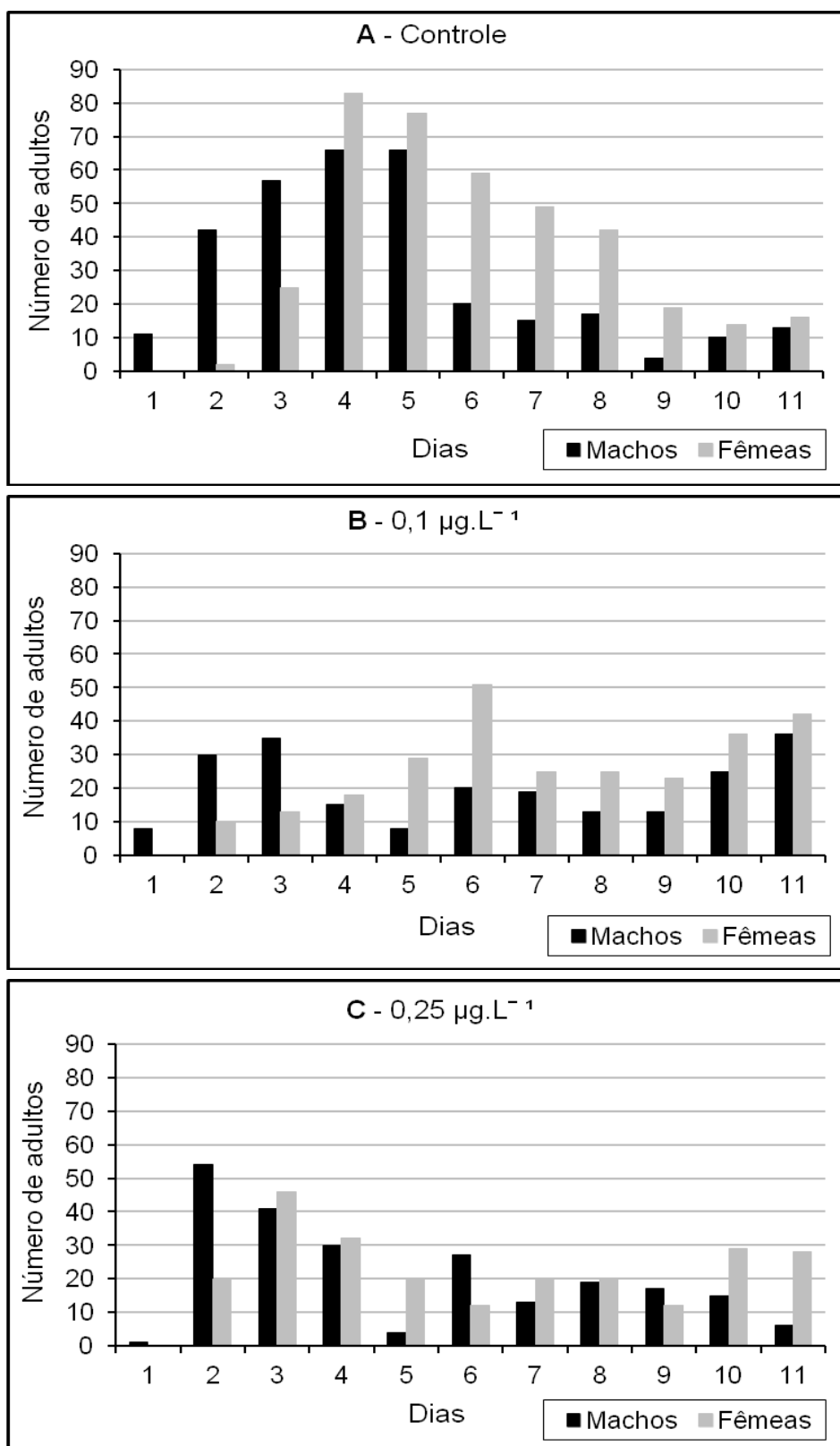


FIGURA 22: Número diário de machos e fêmeas de *Chironomus sancticarioli* provenientes do segundo bioensaio de toxicidade crônica (17 dias) com duas concentrações do inseticida malathion. A – controle; B – concentração de 0,1 $\mu\text{g.L}^{-1}$; C – concentração de 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$. As barras pretas simbolizam o número de machos e as barras cinzas o número de fêmeas.

5.3.2 Fecundidade potencial

Apenas foram mensuradas as asas das fêmeas proveniente do bioensaio número dois, pois apenas neste ensaio as fêmeas foram separadas por dia de emergência.

No total foram medidas 811 asas, porém apenas as fêmeas provenientes das réplicas 2 de cada concentração foram utilizadas para as análises, pois a réplica 1 da concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ apresentou elevada matéria orgânica durante a realização do ensaio, o que provavelmente determinou número reduzido de adultos. Então para melhor comparação dos resultados as réplicas 1 de todas as concentrações foram excluídas. Sendo assim, o número total de asas utilizadas para análise foi de 470.

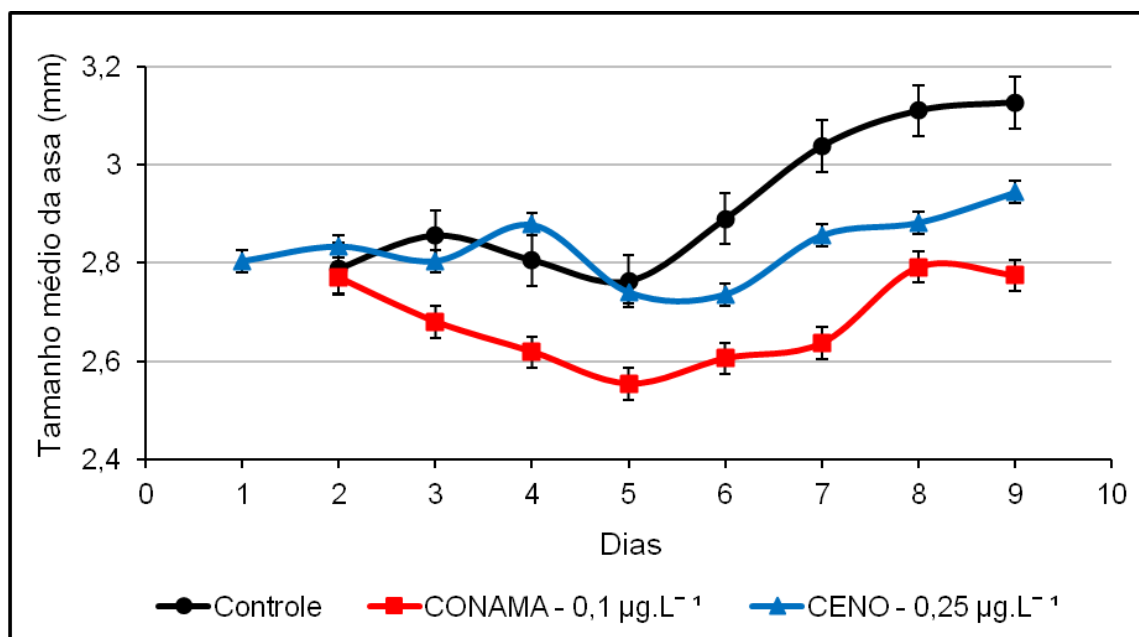


FIGURA 23: Tamanho médio diário das asas das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* provenientes do segundo bioensaio de toxicidade crônica (17 dias) com duas concentrações ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) do inseticida malathion.

Pode-se observar que o comprimento médio das asas das fêmeas apresenta um aumento a partir do sexto dia de emergência em todos os tratamentos e que a concentração de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ foi a que mais afetou o tamanho das asas, apresentando uma redução mais acentuada quando comparada com o controle e a concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 23).

Os resultados para a fecundidade potencial das fêmeas de *C. sancticaroli* indicaram que existem diferenças significativas na fecundidade potencial das fêmeas

da espécie expostas a concentração de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ do inseticida malathion quando comparadas ao controle. Ocorreu uma diminuição de 13% na fecundidade dos organismos expostos a essa concentração, já na dose de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ não foram observadas alterações significativas nesse parâmetro (Figura 24).

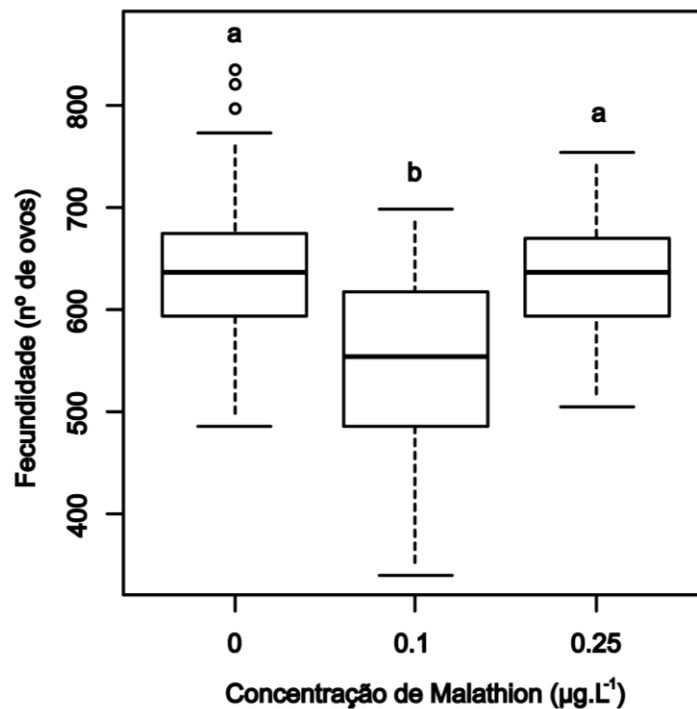


FIGURA 24: Fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli* expostas a duas concentrações ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) do inseticida malathion em bioensaios de toxicidade crônica (17 dias). Os resultados expressam média da fecundidade potencial \pm erro padrão ($n = 173$ para controle, 127 para concentração $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ e 173 para concentração $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA – one way e os contrastes de Tukey).

5.4 CALIBRAÇÃO DO PROTOCOLO DOS ENSAIOS ENZIMÁTICOS

5.4.1 Efeito da centrifugação das amostras

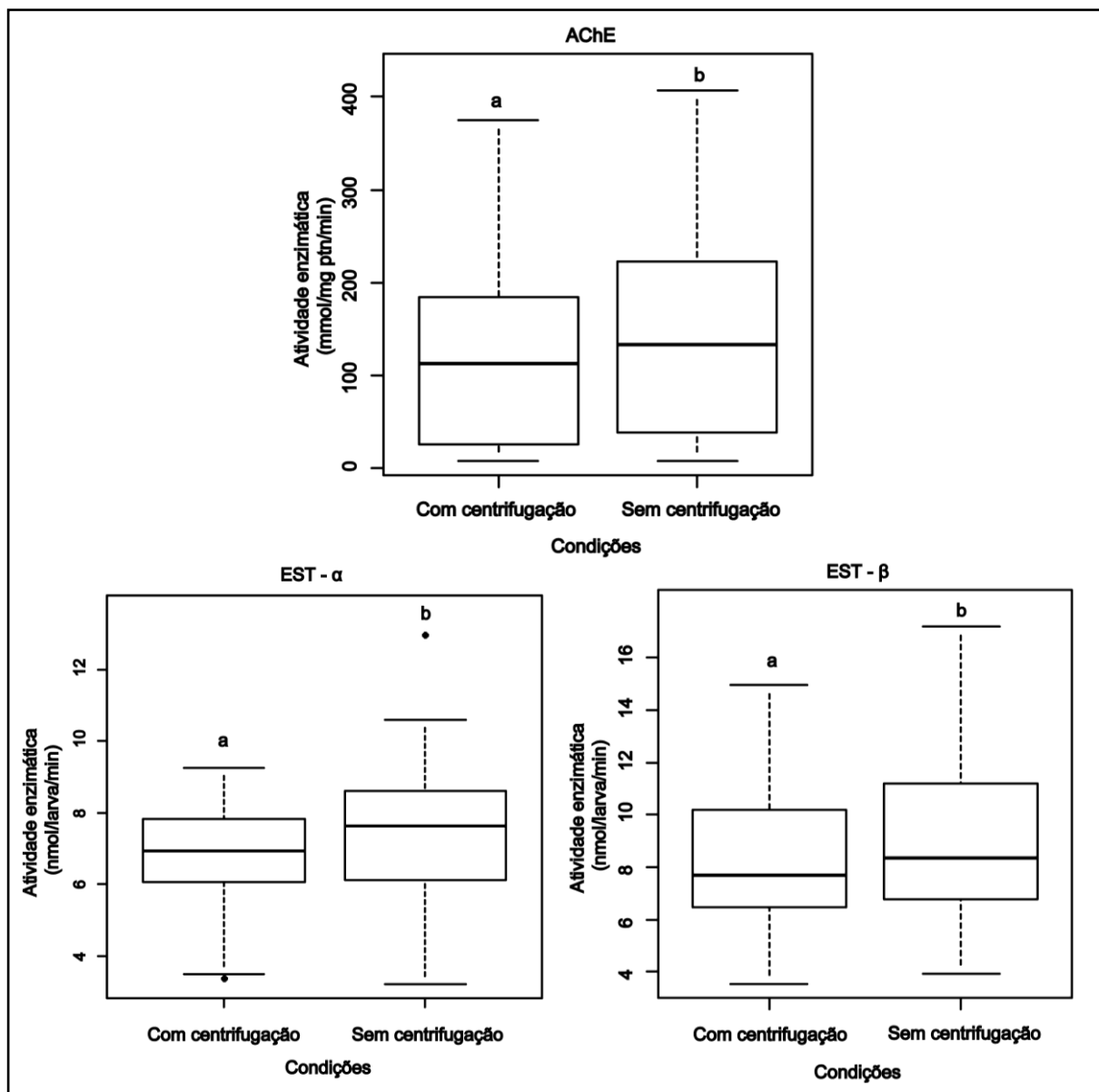


FIGURA 25: Efeito da centrifugação das amostras na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticarioli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 30$ para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T pareado).

Os resultados indicaram que existem diferenças significativas na atividade enzimática das três enzimas entre amostras centrifugadas e não centrifugadas, as atividades enzimáticas diminuem significativamente quando são centrifugadas (Figura 25).

5.4.2 Efeito do congelamento das amostras

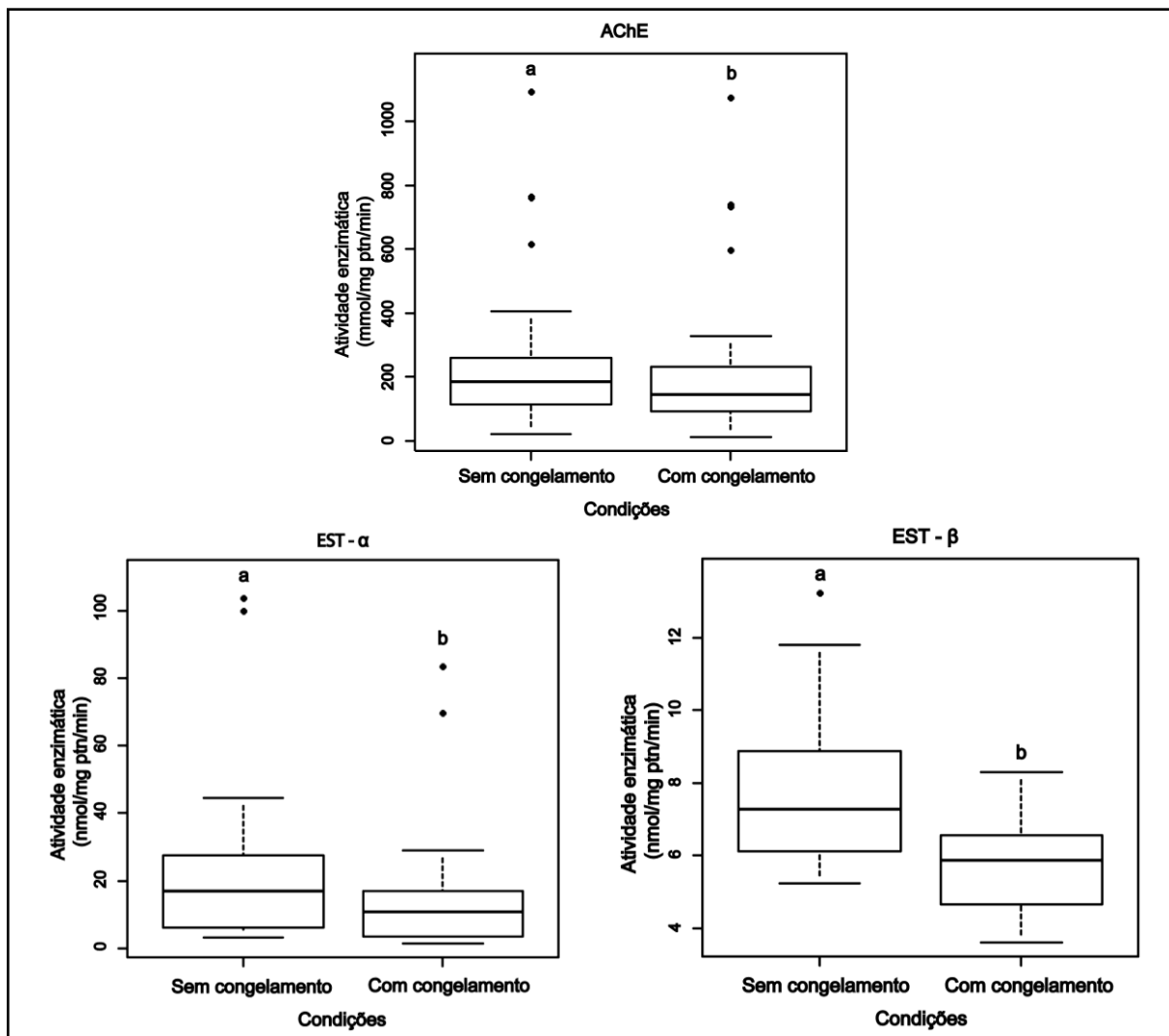


FIGURA 26: Efeito do congelamento das amostras na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticarioli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 30$ para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T pareado).

Os resultados referentes aos efeitos do congelamento das amostras por 30 dias em freezer – -80°C na atividade enzimática das enzimas AChE, EST – α e EST – β indicaram que existem diferenças significativas na atividade enzimática das três enzimas entre amostras congeladas e não congeladas. As atividades enzimáticas das três enzimas diminuem quando são congeladas (Figura 26).

5.4.3 Efeito da temperatura de criação das larvas

As larvas foram criadas nas temperaturas de 20, 25 e 30°C até atingirem o III ínstar final / IV ínstar inicial da fase larval. Ocorreu uma variação no tempo de desenvolvimento para cada temperatura de 12, 7 e 4 dias, respectivamente.

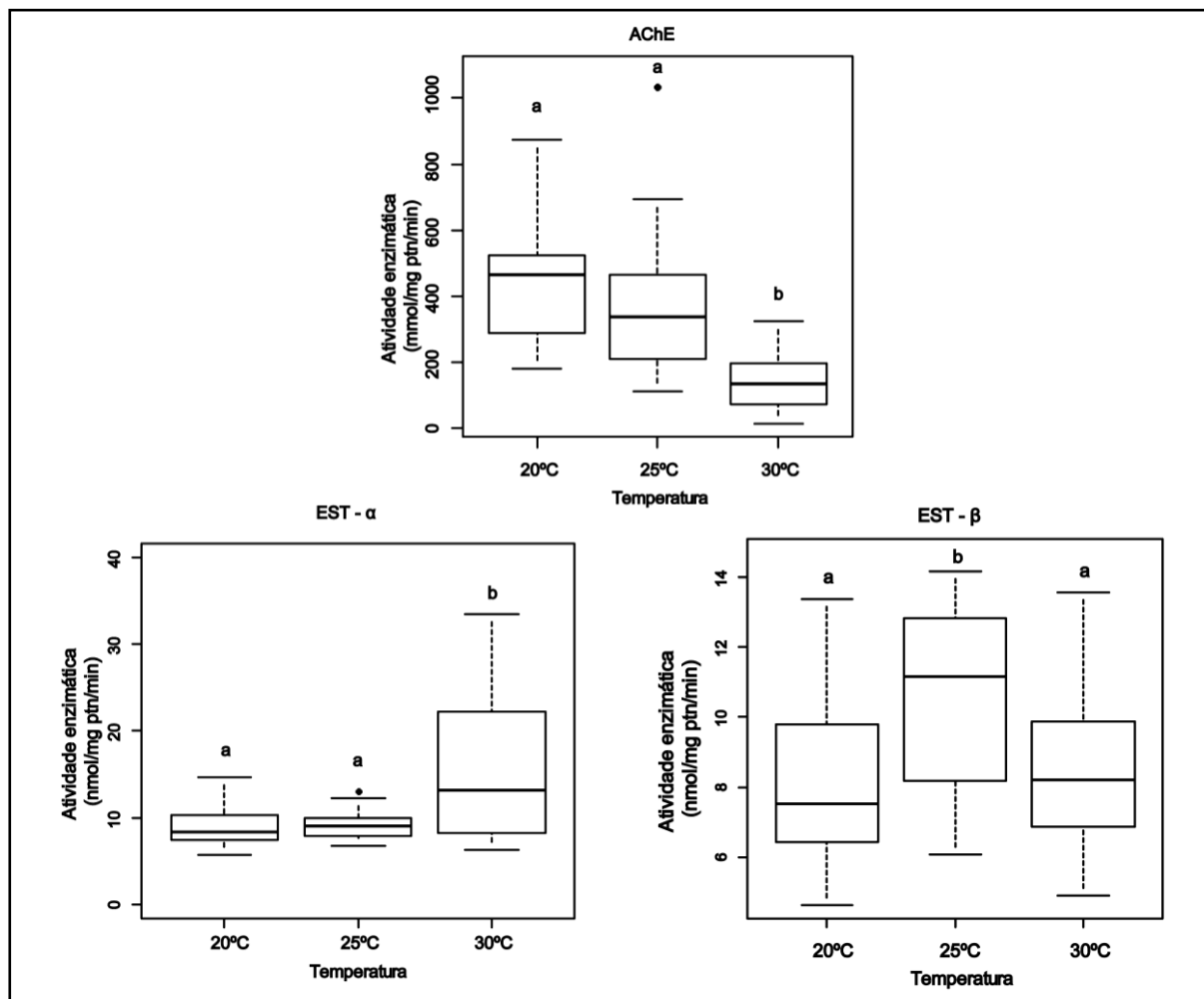


FIGURA 27: Efeito da temperatura (20, 25 e 30°C) de criação das larvas na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticarloi*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando ANOVA – one way e os contrastes de Tukey).

Os resultados relacionados aos efeitos dessas temperaturas na atividade enzimática das enzimas AChE, EST - α e EST - β indicaram que existem diferenças significativas na atividade enzimática das três enzimas entre as diferentes temperaturas de criação testadas (Figura 27).

Cada enzima apresentou um comportamento distinto em relação às temperaturas de criação das larvas. Os resultados mostram que a atividade

enzimática da AChE diminui significativamente quando as larvas são criadas na temperatura de 30°C e não ocorre alteração quando as larvas são mantidas em 20 e 25°C. Já para a enzima EST – α a atividade enzimática aumenta em larvas criadas na temperatura de 30°C, não existindo diferenças significativas no comportamento dessa enzima entre as temperaturas de criação 20 e 25°C. A enzima EST – β apresenta maior atividade em larvas criadas em 25°C e não foram observadas diferenças significativas na atividade dessa enzima nas temperaturas de criação de 20 e 30°C.

5.4.4 Efeito do jejum das larvas

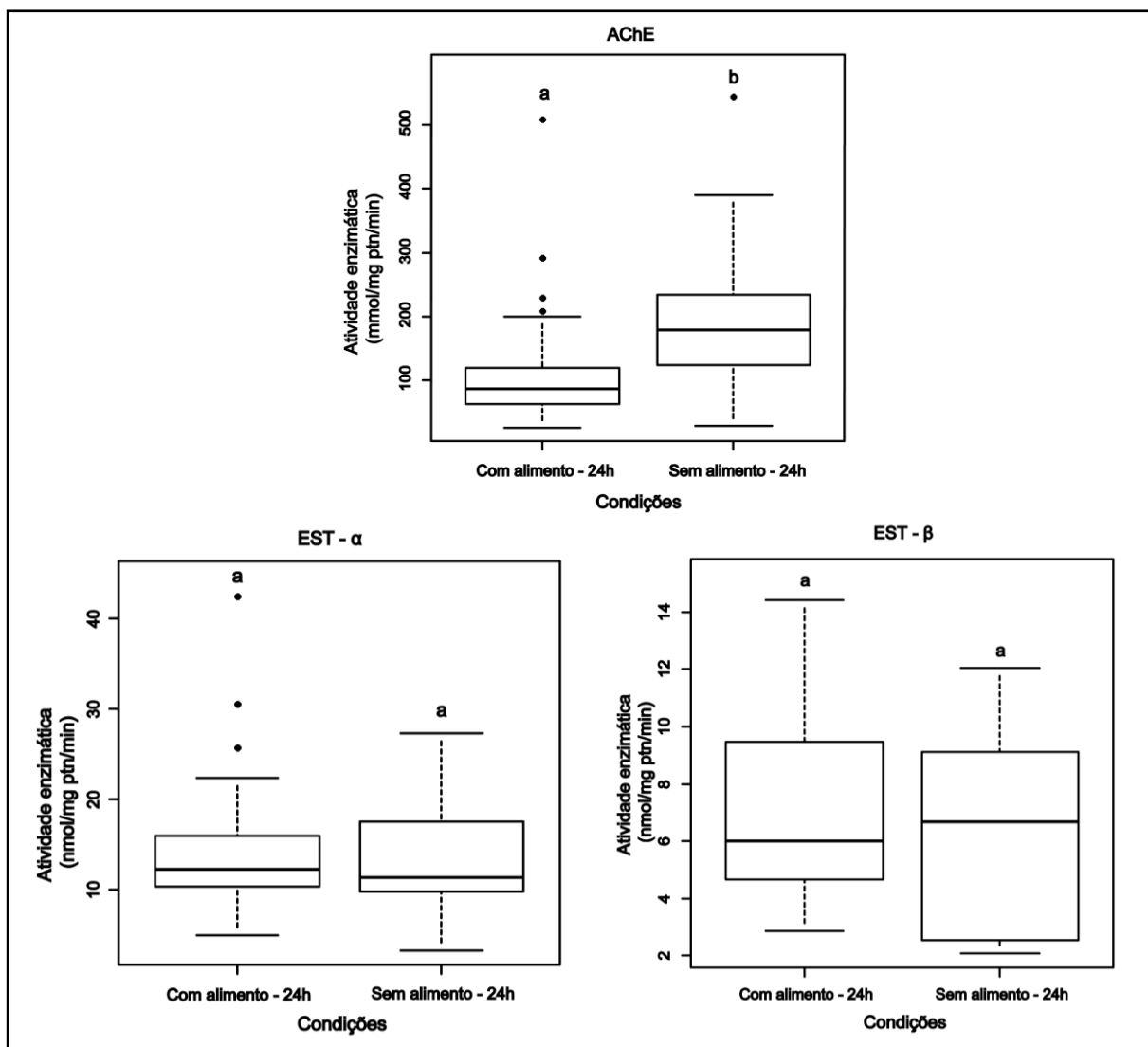


FIGURA 28: Efeito do jejum por 24 horas das larvas na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticarioli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão (n = 30 para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para p < 0,05 (utilizando teste T não pareado).

Os resultados relativos ao efeito do jejum das larvas durante 24, 48 e 72h na atividade enzimática das enzimas AChE, EST – α e EST – β indicaram que existem diferenças significativas na atividade enzimática das enzimas entre algumas condições testadas.

Quando as larvas foram submetidas por 24 horas de jejum ocorreu um aumento significativo na atividade enzimática da enzima AChE, já as enzimas EST – α e EST – β não sofreram alterações significativas nesta condição (Figura 28).

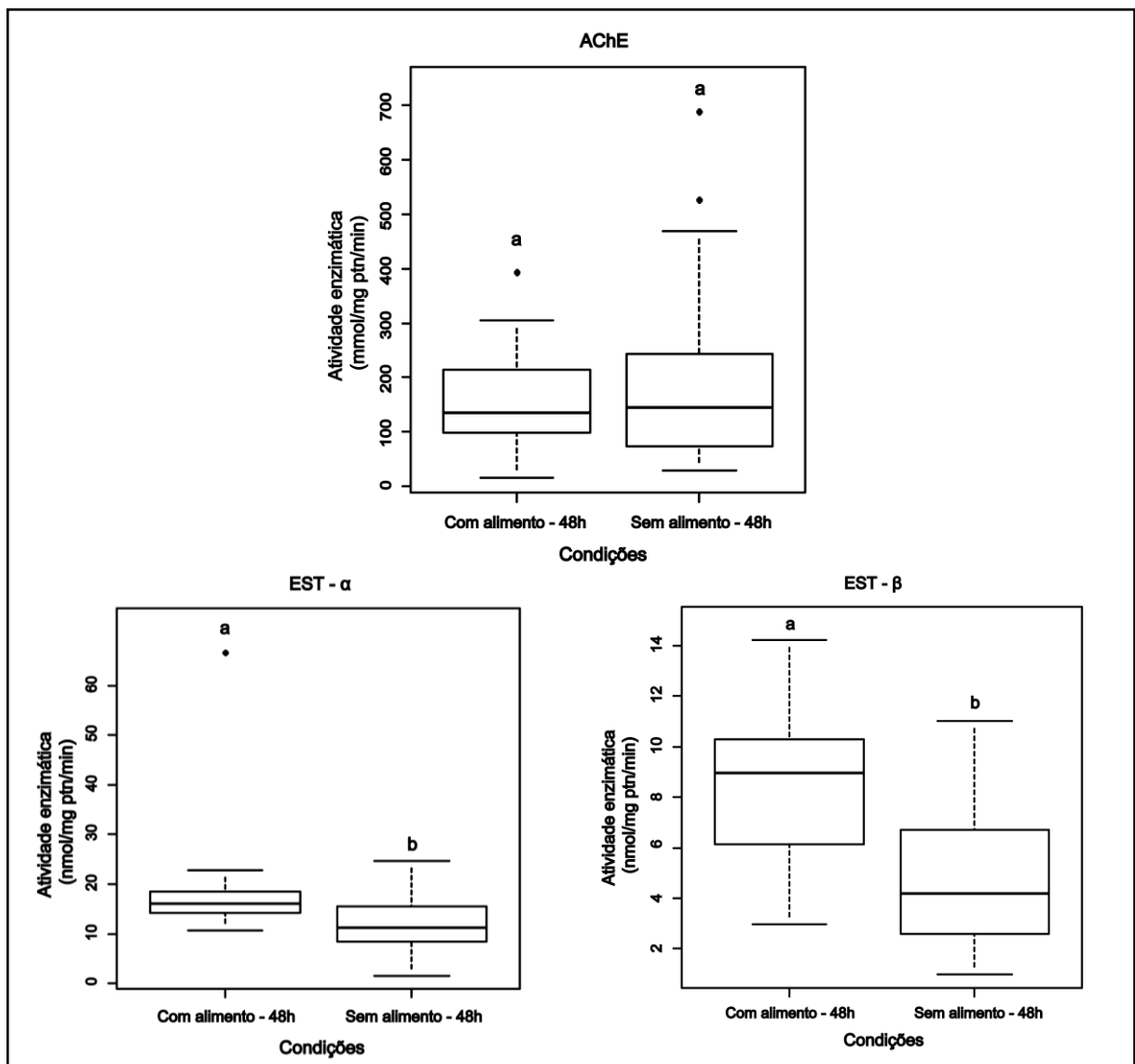


FIGURA 29: Efeito do jejum por 48 horas das larvas na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticarioli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 30$ para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T não pareado).

Quando as larvas foram submetidas por 48 horas de jejum ocorreu uma diminuição significativa na atividade das enzimas EST – α e EST – β , já a enzima AChE não sofreu alteração significativa nesta condição (Figura 29).

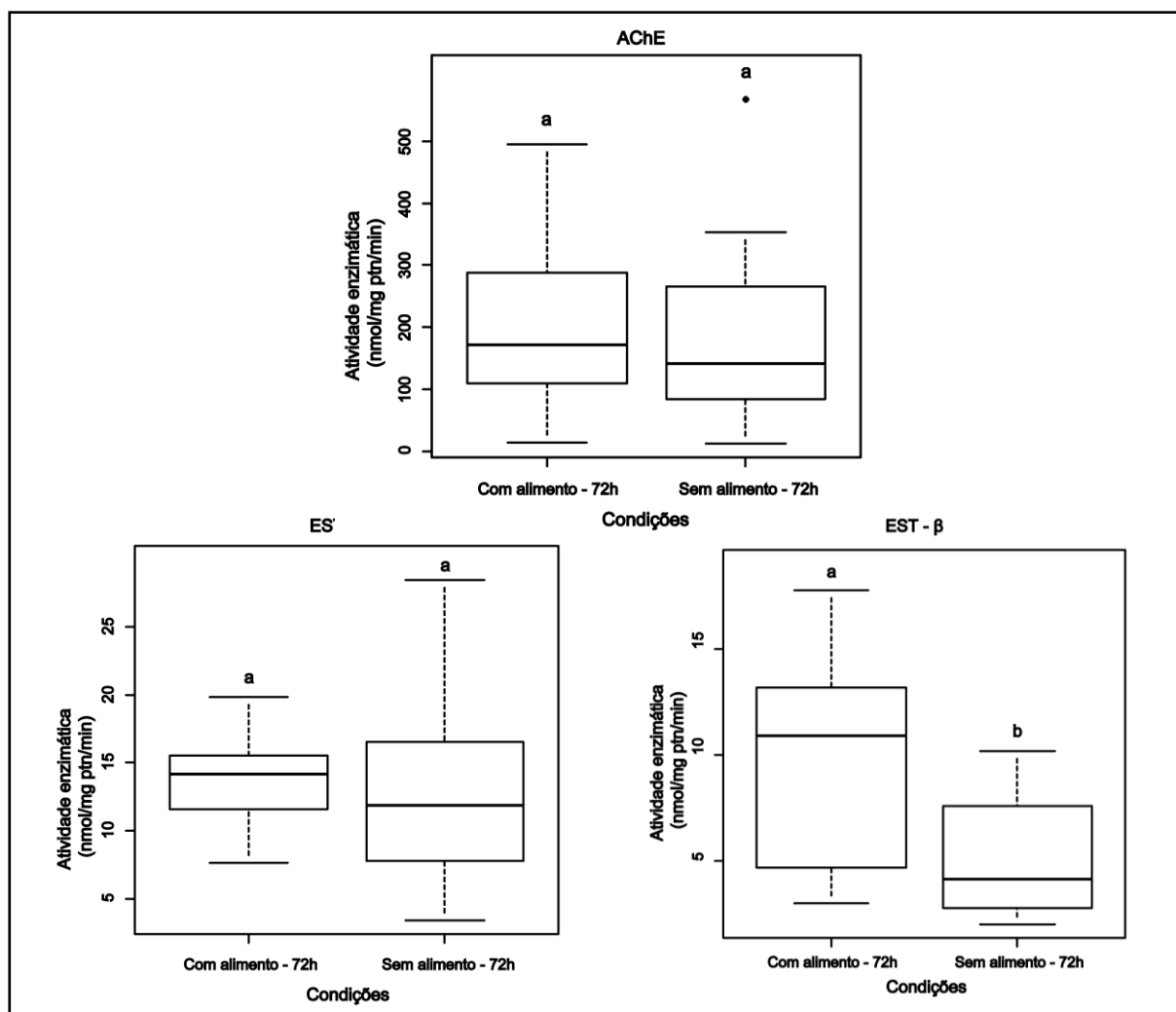


FIGURA 30: Efeito do jejum por 72 horas das larvas na atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) da espécie *Chironomus sancticaroli*. Os resultados expressam média da atividade enzimática \pm erro padrão ($n = 30$ para cada condição). Letras diferentes indicam diferenças significativas para $p < 0,05$ (utilizando teste T não pareado).

Os resultado referentes ao efeito do jejum das larvas por 72 horas indicaram que ocorreu uma diminuição significativa na atividade enzimática da enzima EST – β , já as enzimas AChE e EST – α não foram afetadas significativamente por esta condição (Figura 30).

6 DISCUSSÃO

Conseguir equilibrar as necessidades da sociedade com a sustentabilidade da natureza não é uma tarefa fácil e cada vez mais são presenciados o consumo dos recursos naturais em ritmo maior do que os sistemas biológicos podem renovar e a geração de produtos residuais em quantidades superiores as que podem ser integradas aos ciclos naturais (Zagatto, 2008).

Na tentativa de entender e prevenir essa poluição ambiental crescente é de extrema importância detectar os efeitos que estas substâncias estão causando nos organismos aquáticos.

O presente trabalho determinou a faixa letal do inseticida organofosforado malathion para a espécie *C. sancticaroli*, ou seja, as concentrações do composto que causam a mortalidade de 0 a 99% da população. Inserida nesta faixa está a concentração letal $CL_{50} - 96h$, a qual apresentou o valor de $2,51 \mu g.L^{-1}$ de malathion.

Levando-se em consideração esta dose, observa-se que a espécie *C. sancticaroli* é mais tolerante ao malathion que a espécie *Daphnia magna* Müller, 1785 (Crustacea: Cladocera: Daphniidae), a qual é um microcrustáceo de água doce amplamente utilizado em testes de toxicidade (Buratini *et al.*, 2004) e apresenta o valor de $CL_{50} - 48h$ $0,72 \mu g.L^{-1}$ para o malathion (WHO, 2003) e mais sensível que a espécie *Utterbackia imbecillis* Say, 1829 (Mollusca: Bivalvia: Unionidae), a qual é um molusco de água doce também utilizada em bioensaios de toxicidade (Connors & Black, 2004) apresentando o valor de $CL_{50} - 96h$ $350 mg.L^{-1}$ para o malathion (Keller & Ruessler, 1997).

O fato da espécie *C. sancticaroli* ser mais tolerante ao malathion do que a espécie *D. magna* e ser mais sensível do que a espécie *U. imbecillis* pode ser explicada por diversos fatores isolados ou combinados: natureza química do produto; hábitos de vida e as características do metabolismo de cada espécie.

O malathion apresenta uma solubilidade em água de $145 mg.L^{-1}$ a $25^{\circ}C$ (NPIC, 2010), portanto o composto se distribui nos ecossistemas aquáticos de uma forma homogênea. Porém, diferentes hábitos de vida podem fazer com que determinado organismo fique mais exposto ao inseticida do que outro.

O microcrustáceo *D. magna* possui o hábito planctônico filtrador, por isso, suas atividades são realizadas na coluna d'água (Koivisto, 1995). Já o molusco *U.*

imbecillis e as larvas de *C. sancticaroli* apresentam o hábito bentônico. *C. sancticaroli* pode colonizar os diversos substratos localizados no fundo dos ecossistemas aquáticos: areia, folhço, cascalho, entre outros (Strixino & Trivinho-Strixino, 1998). Além disso, constroem tubos, os quais são formados por partículas do substrato unidas por seda, secretada pelas glândulas salivares (Walshe, 1951). Esses tubos aumentam a aquisição de alimento e oxigênio (Brackenbury, 2000) e fornecem proteção contra predadores (Tokeshi, 1995) e substâncias tóxicas presentes na água, como observado por Halpern *et al.* (2002), os quais verificaram que larvas da espécie *Chironomus luridus* Strenzke, 1959 submetidas a exposição ao cobre apresentaram menor mortalidade quando estavam dentro dos tubos em comparação com larvas expostas as mesmas condições porém sem tubos. Portanto, o hábito bentônico somado a produção de tubos na espécie *C. sancticaroli* pode proporcionar essa diferença de sensibilidade entre as espécies.

Além disso, a toxicidade é considerada espécie-específica para cada produto e ela é determinada principalmente pela capacidade de uma espécie em metabolizar o composto de origem em formas mais ou menos tóxicas, e pela suscetibilidade do sítio alvo ao qual o agente tóxico irá agir (Keizer *et al.*, 1995).

Quando um ser vivo entra em contato com um inseticida organofosforado a reação do organismo é eliminar este composto o mais rápido possível. Para isso o sistema de defesa deve oxidar o inseticida em um composto mais solúvel, no caso do inseticida malathion o novo composto é o maloxon (Galloway & Handy, 2003) Porém, este metabólito gerado apresenta afinidade pela enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual é considerada o sítio-alvo dos organofosforados e por isso impedida de realizar suas funções biológicas, podendo levar a morte do indivíduo (Santos *et al.*, 2007).

Organismos de espécies diferentes apresentam variações nas taxas de transformação metabólicas para um determinado xenobiótico, além de que o mesmo sítio-alvo localizado em espécies distintas pode possuir afinidades diferentes pelo composto. Este fato já foi documentado em peixes, Keizer *et al.* (1995) observaram que a espécie *Poecilia reticulata* Peters, 1859 (Pisces: Teleostei) era mais sensível ao inseticida organofosforado diazinon quando comparada com outras três espécies de peixes porque tinha a capacidade de transformar o diazinon em um metabólito mais tóxico e apresentava colinesterases mais sensíveis.

Moluscos adultos são conhecidos por terem uma capacidade de biotransformação reduzida quando comparados a crustáceos e insetos (Livingstone, 1998). Essas diferenças nas taxas metabólicas, associadas aos diferentes hábitos de vida podem explicar a variação de sensibilidade entre *U. imbecillis*, *D. magna* e *C. sancticaroli*.

A quantificação efetiva do quanto um determinado composto afeta um organismo pode ser mensurada através de biomarcadores bioquímicos, como a atividade enzimática das enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β). Estas respostas permitem a detecção dos primeiros efeitos biológicos relacionados com a exposição a produtos antropogênicos tóxicos (Lionetto *et al.*, 2003).

Previamente a utilização dessas enzimas como biomarcadores, foi verificado o efeito de alguns fatores relacionados diretamente o com protocolo de quantificação enzimática, como o efeito da centrifugação e do congelamento das amostras. Além disso, foi caracterizada a variabilidade natural dessas enzimas dependendo do estado fisiológico e nutricional das larvas utilizadas para a quantificação enzimática, como o efeito de diferentes temperaturas de criação das larvas e o efeito do jejum.

As atividades enzimáticas das enzimas AChE, EST - α e EST - β diminuíram significativamente quando as amostras foram centrifugadas. Este resultado foi encontrado também por Guilhermino (1996), a qual quantificou a atividade da enzima AChE para o microcustáceo *D. magna*. Parte da enzima pode ser removida do sobrenadante durante a centrifugação por permanecer ligada aos fragmentos de maiores dimensões que se depositam nesse processo (Guilhermino, 1996).

Mesmo que o processo de centrifugação tenha causado esse efeito negativo na atividade enzimática, o presente trabalho utilizou este procedimento em todos os protocolos enzimáticos, pois dessa forma poderiam ser obtidas amostras mais límpidas para a realização dos ensaios enzimáticos, não interferindo nas leituras de absorbâncias.

Nos ensaios realizados com amostras congeladas por 30 dias em freezer - 80°C foram observadas diminuições significativas das atividades enzimáticas das três enzimas. Este é um comportamento comum das enzimas em geral e existe uma tendência da atividade enzimática diminuir cada vez mais a cada ciclo de congelamento-descongelamento (Murias *et al.*, 2005).

Portanto, é extremamente necessária a padronização da rotina laboratorial, eliminando a possibilidade de que algumas amostras sejam congeladas e outras não, com o objetivo de evitar resultados assimétricos entre as amostras. No presente trabalho, nenhuma amostra proveniente dos bioensaios de toxicidade aguda e crônica foi submetida ao congelamento.

Todos os organismos apresentam uma faixa de temperatura ideal para a sobrevivência. Mudanças nessas faixas podem ser estressantes, principalmente para moléculas biológicas, tais como enzimas, as quais sofrem alterações dependendo da temperatura em que são expostas (Menezes *et al.*, 2006). Este fator abiótico altera a estrutura física das enzimas, modificando sua eficiência catalítica ou capacidade de ligação (Hochachka & Somero, 1984).

No presente trabalho, a enzima AChE apresentou elevada atividade enzimática nas temperaturas de 20 e 25°C e uma redução significativa na temperatura de 30°C. Os efeitos da temperatura em biomarcadores bioquímicos, como a enzima AChE, vêm sendo analisados em vertebrados, principalmente em peixes (Hogan, 1970) e em espécies de invertebrados (Scaps & Borot, 2000; Callaghan *et al.*, 2002; Pfeifer *et al.*, 2005; Menezes *et al.*, 2006; Cailleaud *et al.*, 2007 e Thi Tu *et al.*, 2012). Aparentemente não existe um padrão entre os resultados da enzima AChE nesses estudos realizados com invertebrados, podendo a atividade enzimática aumentar ou diminuir à medida que a temperatura aumenta. Portanto, pode-se concluir que os efeitos da temperatura sobre a atividade da AChE são variáveis de acordo com a espécie e métodos utilizados (Scaps & Borot, 2000).

Dentre as espécies de Chironomidae o padrão aparentemente encontrado para o efeito da temperatura na enzima AChE é esta diminuir sua atividade de acordo com o aumento da temperatura. Este resultado foi encontrado no presente trabalho e por Domingues *et al.* (2007), os quais observaram uma maior atividade da enzima AChE em temperaturas menores (6 e 16°C) quando comparada com a temperatura de 26°C na espécie *Chironomus riparius* Meigen, 1804.

Olsen *et al.* (2001), avaliaram a eficácia da enzima AChE em estudos de campo, levando em consideração apenas a variação dos fatores abióticos encontrados entre 13 locais não contaminados do sudeste da Inglaterra. Os autores mensuraram a temperatura da água de todos os locais e esta variou de 11,9°C a 21,5°C, porém esta variação não afetou significativamente a atividade da enzima

AChE, portanto, os autores consideraram a enzima como um biomarcador aplicável para estudos de campo.

Como no presente trabalho uma redução significativa da atividade dessa enzima foi encontrada devido a altas temperaturas (30°C), deve-se tomar o cuidado para não confundir esta redução com uma inibição da AChE, por causa da presença de agentes anticolinesterásicos, em estudos de campo nas regiões tropicais com a espécie *C. sancticaroli*.

As enzimas de metabolismo esterase alfa (EST - α) e esterase beta (EST - β) apresentaram comportamentos diferenciados com relação à temperatura de criação das larvas. A enzima EST - α possui maior atividade na temperatura de 30°C e a enzima EST - β na temperatura de 25°C, evidenciando ainda mais o fato de que cada enzima apresenta uma temperatura ótima de atividade (Callaghan *et al.*, 2002) e que este fator deve ser levado em consideração quando estas enzimas forem aplicadas como biomarcadoras de contaminação ambiental em ecossistemas aquáticos.

Os bioensaios de toxicidade aguda geralmente são realizados na ausência de alimentação, por isso a variabilidade natural das enzimas foi caracterizada para esta condição de jejum. Os resultados indicam que cada enzima apresenta um comportamento diferenciado com relação ao tempo em que as larvas não se alimentam. A enzima EST - α alterou-se apenas quando as larvas foram expostas a condição de inanição por 48 horas e a enzima EST - β apresentou diferença significativa nos tempos de 48 e 72 horas sem alimentação. A enzima AChE mostrou-se alterada apenas quando as larvas ficaram sem alimentação por 24 horas, já nos outros dois tempos de inanição (48 e 72 horas) a enzima não foi afetada. Este resultado já foi relatado por Crane *et al.* (2002), os quais não observaram diferenças na atividade da enzima AChE da espécie *C. riparius* após 96h sem alimentação. Diante deste cenário não foi possível descrever um padrão lógico com relação ao efeito da ausência de alimentação sobre as enzimas de *C. sancticaroli*, entretanto, estes resultados devem ser considerados no momento da realização dos bioensaios de toxicidade quando os biomarcadores utilizados forem as enzimas AChE, EST - α e EST - β .

A quantificação da atividade enzimática da AChE é um biomarcador sensível para detectar a exposição aos compostos organofosforados (Callaghan *et al.*, 2001). Neste sentido, a enzima é amplamente utilizada em estudos de toxicidade com os

mais diversos organismos aquáticos, entre eles, peixes (Roex *et al.*, 2003; Monteiro *et al.*, 2005; Guimarães *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Hernández-Moreno *et al.*, 2011 e Sharbidre *et al.*, 2011); crustáceos (Lundebye *et al.*, 1997; Forget *et al.*, 2002; Jemec *et al.*, 2007; Xuereb *et al.*, 2009 e Gorokhova *et al.*, 2010); moluscos (Rickwood & Galloway, 2004 e Kristoff *et al.*, 2006); anelídeos (Kristoff *et al.*, 2006) e insetos (Tessier *et al.*, 2000; Maycock *et al.*, 2003; Koodalingam *et al.*, 2011 e Printes *et al.*, 2011).

Embora as enzimas de metabolismo esterase alfa (EST – α) e esterase beta (EST – β) sejam as principais responsáveis pela eliminação de compostos organofosforados, não existem muitos estudos na área de ecotoxicologia nos quais elas sejam aplicadas como biomarcadoras (Rakotondravelo *et al.*, 2006 e Jin-Clark *et al.*, 2008). Os principais trabalhos relacionados a estas enzimas estão localizados na área da saúde pública, pois são quantificadas em insetos vetores de doenças e consideradas um dos motivos da resistência metabólica aos inseticidas nesses vetores (Hemingway & Ranson, 2000).

Segundo a resolução 357, de 17 Março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), a qual proíbe o lançamento de poluentes em níveis nocivos ou perigosos para os seres humanos e outras formas de vida, o valor de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ de malathion não deveria afetar o equilíbrio ecológico aquático dos rios por eles classificados como Classe 1, os quais suas águas podem ser destinadas, entre outras aplicações, à proteção das comunidades aquáticas.

Nesta concentração não foram observados efeitos de mortalidade nas larvas de III ínstar final da espécie *C. sancticaroli* expostos por um curto período de tempo ao composto (96h), porém, esta exposição resultou em um decréscimo significativo de 46 e 24% nas atividades enzimáticas das enzimas AChE e EST – β respectivamente. Estes resultados indicam uma inibição considerável da atividade das enzimas, afetando seriamente o metabolismo e consequentemente o fitness dos organismos.

Quando a espécie foi exposta desde a fase de ovo a esta mesma dose do inseticida ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$), ocorreu uma redução na atividade enzimática das enzimas AChE, EST – α e EST – β de, respectivamente 15, 8 e 5%, porém esta redução não foi considerada significativamente diferente do controle. Rakotondravelo *et al.* (2006), encontraram uma inibição de 59, 30 e 48% respectivamente para as mesmas três enzimas quando a espécie *Chironomus tentans* Fabricius, 1805 foi

exposta cronicamente a essa concentração, porém do inseticida organofosforado clorpirifós. Esta diferença pode estar relacionada com a toxicidade do inseticida clorpirifós, o qual já foi relatado como sendo mais nocivo do que o malathion em espécies de Chironomidae (Stevens, 1992).

A exposição crônica é considerada a que mais se aproxima com o que observamos nos ambientes impactados com xenobióticos e como neste trabalho foi utilizada a concentração máxima permitida pelo CONAMA para rios de classe 1 ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$) e esta apresentou alterações enzimáticas quando os organismos foram expostos cronicamente, podemos concluir que a contínua liberação desse composto, mesmo que nessa pequena dose aceitável pelos órgãos oficiais de monitoramento, podem determinar efeitos graves na biologia da espécie *C. sancticaroli*.

A concentração de efeito não observável (CENO) é definida como a maior concentração de uma substância tóxica a qual os organismos são expostos em um teste que não cause efeitos adversos observáveis (USEPA, 2000). Geralmente esta concentração é calculada a partir de bioensaios de toxicidade crônica, porém podem ser realizadas estimativas dessa concentração a partir de bioensaios de toxicidade aguda, os quais são mais fáceis de serem executados (Beyers & Sikoski, 1994).

A CENO estimada neste trabalho foi de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o malathion. Não foram observadas mortalidades nessa concentração quando os organismos foram expostos em bioensaios de toxicidade aguda (96h), porém reduções significativas foram encontradas na atividade das enzimas AChE, EST – α e EST – β respectivamente de 66, 40 e 37%. Portanto, uma concentração que não deveria afetar os organismos apresentou inibições consideradas elevadas.

Este mesmo resultado foi encontrado por Beyers & Sikoski (1999), os quais observaram uma inibição de 23,8% na atividade da AChE quando a espécie de peixe *Ptychocheilus lucius* Girard, 1856 foi exposta a concentração de efeito não observado calculada para a espécie. Jin-Clark *et al.* (2008), expuseram a espécie *C. tentans* a concentração de $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ do inseticida organofosforado clorpirifós e obtiveram uma inibição de 70% da enzima AChE. Segundo Day & Scott (1990) reduções acima de 50% da enzima AChE geralmente indicam que os organismos não irão sobreviver, embora existam diferentes sensibilidades entre os indivíduos.

Quando os organismos da espécie *C. sancticaroli* foram expostos cronicamente a concentração CENO foram observadas reduções significativas de 28 e 15% respectivamente nas atividades enzimáticas das enzimas AChE e EST – α .

Segundo Buchwalter *et al.* (2004), existem diferenças de sensibilidade entre os instares larvais de uma mesma espécie, geralmente as larvas mais jovens toleram menos o contato com produtos químicos. Portanto, esta inibição enzimática encontrada para a espécie *C. sancticaroli* pode ser atribuída ao fato dos bioensaios de toxicidade crônica serem realizados com organismos da espécie desde a fase de ovo, por isso, mais sensíveis.

Quando são comparadas as respostas dos bioensaios de toxicidade aguda com os bioensaios de toxicidade crônica para as mesmas concentrações de malathion (0,1 e 0,25 $\mu\text{g.L}^{-1}$), são observados maiores efeitos na atividade das três enzimas quando as larvas foram expostas de forma aguda ao inseticida. Estes resultados são diferentes do relatado por Rakotondravelo *et al.* (2006), os quais encontraram maior inibição da enzima em larvas de quironomídeos expostos a uma concentração menor, porém de forma crônica, do que uma concentração maior através da exposição aguda. Entretanto, os resultados do presente estudo podem ser explicados pelos próprios mecanismos bioquímicos de detoxificação dos organismos, os quais são afetados na fase inicial de exposição e posteriormente ocorre uma recuperação destes sistemas, garantindo assim a sobrevivência dos organismos em baixas concentrações do inseticida (Hemingway & Karunaratne, 1998).

Em diversos estudos são relatados uma relação diretamente proporcional entre concentração e inibição enzimática (Callaghan *et al.*, 2001; Forcella *et al.*, 2007; Printes *et al.*, 2007 e Mehler *et al.*, 2008). Esta relação dose-dependente foi encontrada no presente trabalho para as três enzimas analisadas, porém a partir da concentração sub-letal CL_{10} (1,37 $\mu\text{g.L}^{-1}$) a inibição foi tão alta (AChE: 97%, EST – α : 85% e EST – β : 80%) que se manteve constante para as outras duas concentrações expostas (CL_{30} – 1,97 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e CL_{50} – 2,51 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Estes resultados estão de acordo com a literatura, a qual apresenta estudos que indicam inibições enzimáticas acima de 50% quando organismos da família Chironomidae são expostos a concentrações letais médias (Sturm & Hansen, 1999 e Maycock *et al.*, 2003).

Esses resultados revelam ainda que as larvas são capazes de sobreviver, pelo menos por curtos períodos de tempo, com altos níveis de inibição da enzima AChE, como evidenciado por Domingues *et al.* (2007), onde larvas de *C. riparius* foram expostas ao organofosforado dimethoato e ficaram vivas mesmo apresentando 66% de inibição. Berra *et al.* (2006), observaram que a espécie

Hydropsyche pellucidula Curtis, 1834 (Trichoptera: Hydropsychidae) é capaz de sobreviver ao fenitrothion mesmo com uma inibição de 97% da atividade enzimática.

Um efeito comportamental característico observado em organismos expostos a compostos organofosforados é a dificuldade de locomoção ou paralisia, atribuída a inibição da enzima AChE, a qual é responsável pelo bom funcionamento do sistema nervoso dos indivíduos. Esta paralisia foi observada principalmente nos organismos expostos a concentração mais alta de malathion ($2,51 \mu\text{g.L}^{-1}$) e apresenta graves consequências ecológicas no ambiente, uma vez que as larvas são incapazes de se protegerem no substrato ou através da construção dos tubos de seda e por isso ficam mais suscetíveis a predação ou podem ser levadas pelas correntes de água (Callaghan *et al.*, 2001).

No segundo bioensaio de toxicidade crônica realizado, tanto na concentração $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, quanto na dose $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$ foram observados a emergência inicial dos machos. Esta é uma característica comum relacionada com a reprodução da população, pois os adultos apresentam um tempo de vida efêmero, dessa forma, a intenção é que no momento em que ocorra a emergência das fêmeas estas já encontrem parceiros para a realização da cópula, impedindo assim que elas venham a morrer antes mesmo de conseguirem deixar seus descendentes (Callaghan *et al.*, 2001).

No entanto, no primeiro bioensaios de toxicidade crônica, esse padrão na emergência dos adultos não foi observado, dessa forma, não foi possível estabelecer exatamente quais foram os efeitos do inseticida malathion na emergência dos adultos de *C. sancticaroli*. Seria necessário um maior número de experimentos para que se encontre um padrão nas respostas.

Com relação à proporção de machos e fêmeas provenientes desses dois bioensaios pode-se afirmar que a exposição ao inseticida malathion não afetou este parâmetro, resultado este ecologicamente positivo para a conservação da espécie.

O significado ecológico de qualquer resposta é questionável a menos que possa estar relacionado a uma mudança biológica que tenha efeito na população (Callaghan *et al.*, 2001). Os resultados da exposição das larvas de *C. sancticaroli* a concentração máxima liberada pelo CONAMA ($0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$) se mostrou nociva aos organismos através das reduções das atividades enzimáticas, entretanto, o principal efeito observado dessa concentração foi na fecundidade potencial (número de

óvulos presentes dentro do abdome) das fêmeas, a qual apresentou uma redução de 13% no número de ovos que elas poderiam potencialmente ovipositar.

Resultado semelhante foi encontrado por Crane *et al.* (2002), os quais expuseram larvas da espécie *C. riparius* ao inseticida organofosforado pirimiphos methyl e obtiveram reduções na fecundidade realizada (número real de ovos ovipostos), sugerindo assim uma redução no fitness individual de cada organismo exposto ao inseticida.

Como a fecundidade potencial não foi afetada pela concentração mais alta ($0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$) não foi possível estabelecer exatamente os efeitos que o inseticida malathion causa na espécie. Entretanto, não pode ser assumido que esta concentração não cause problemas para a população, pois podem ter ocorrido efeitos na fertilidade e/ou fecundidade realizada das fêmeas, os quais não foram mensurados neste trabalho, porém já foram relatados na literatura como efeitos nocivos encontrados para espécies de quironomídeos expostos a compostos químicos (Hwang *et al.*, 2001). Mais experimentos deverão ser realizados para se determinar os reais efeitos deste composto sobre a fecundidade de *C. sancticaroli*.

A quantificação enzimática mostrou-se ferramenta eficiente na detecção de alterações precoces em imaturos de *C. sancticaroli*, em larvas consideradas vivas ocorrem distúrbios no sistema nervoso e no metabolismo mesmo nas menores concentrações do inseticida malathion a que foram expostas. Entretanto, para reprodutibilidade dos resultados devem-se padronizar todos os procedimentos laboratoriais relacionados com as enzimas a serem quantificadas, em vista dos efeitos encontrados com relação à centrifugação e congelamento das amostras, além da temperatura de manutenção e estado nutricional das larvas.

Os bioensaios de toxicidade aguda e crônica auxiliaram de forma positiva a detecção dos efeitos que o inseticida malathion causa na espécie *C. sancticaroli*. No entanto, evidencia-se o fato de que os bioensaios crônicos apresentam um grau de complexidade de execução elevado em comparação ao bioensaio de toxicidade aguda, porém os ensaios crônicos se aproximam e reproduzem, em laboratório, as condições encontradas nos ambientes impactados, proporcionando resultados mais consistentes com relação aos efeitos do inseticida malathion, o qual se mostrou altamente tóxico a espécie *C. sancticaroli*.

7 CONCLUSÃO

- A faixa letal do inseticida malathion para a espécie *Chironomus sancticaroli* varia de 0,95 a 7,51 $\mu\text{g.L}^{-1}$;
- Em larvas de *Chironomus sancticaroli* mantidas em diferentes temperaturas (20, 25 e 30°C) e estados nutricionais (24, 48 e 72 horas com e sem alimentação), as enzimas acetilcolinesterase (AChE), esterase alfa (EST – α) e esterase beta (EST – β) apresentaram heterogeneidade em suas atividades;
- Amostras centrifugadas e congeladas apresentaram redução da atividade enzimática das três enzimas analisadas;
- Foi detectado em *Chironomus sancticaroli* inibição na atividade enzimática das três enzimas em todas as concentrações testadas do inseticida malathion, inclusive na concentração máxima permitida pelo CONAMA para rios de classe 1;
- A rápida exposição das larvas de *Chironomus sancticaroli* através de bioensaios de toxicidade aguda gera maior inibição nas atividades enzimáticas das três enzimas, quando comparadas à exposição crônica, para uma mesma concentração de malathion;
- Não foi possível estabelecer o real efeito do inseticida malathion na fecundidade potencial das fêmeas de *Chironomus sancticaroli*, pois esta sofreu diminuição na menor concentração e não foi alterada na maior dose testada do inseticida.

REFERÊNCIAS

Adams, W. J. & Rowland, C. D. 2003. Aquatic Toxicology test methods. . In: Hoffman, D. J.; Rattner, B. A.; Burton Jr., G. A. & Cairns Jr., J. Handbook of Ecotoxicology. 2ª ed. Boca Raton: Lewis Publishers. p. 19-43.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2003. **Toxicological profile for malathion**. U.S. Public Health Service. 327p.

Aldridge, W.N. 1953. Serum esterases. **Biochemical Journal**. v. 53, p. 110-117.

Allee, W. C.; Emerson, A. E.; Park, O.; Park, T. & Schmidt, K.P. 1949. **Principles of Animal Ecology**. Filadélfia, W.B. saunders & Co., 837p.

Almeida, P.J. 2002. **Intoxicação por agrotóxicos: informações selecionadas para abordagem clínica e tratamento**. 1ª ed. São Paulo: Andrei, 165p.

Alonzo, H. G. A. & Corrêa, C. L. 2008. Praguicidas. In: Oga, S.; Camargo, M. M. A. & Batistuzzo, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. p. 621-642.

Anderson, T. D.; Jin-Clark, Y.; Begum, K.; Starkey, S. R. & Zhu, K. Y. 2008. Gene expression profiling reveals decreased expression of two hemoglobin genes associated with increased consumption of oxygen in *Chironomus tentans* exposed to atrazine: A possible mechanism for adapting to oxygen deficiency. **Aquatic Toxicology**. v. 86, p. 148-156.

Aragão, M. A. & Araújo, R. P. A. 2008. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 2ª ed. São Carlos, Brasil: Rima. p. 117-152.

Berra, E.; Forcella, M.; giacchini, R.; Rossaro, B & Parenti, P. 2006. Biomarkers in caddisfly larvae of the species *Hydropsyche pellucidula* (Curtis, 1834) (Trichoptera: Hydropsychidae) measured in natural populations and after short term exposure to fenitrothion. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** . v. 76, p. 863-870.

Beyers, D. W. & Sikoski, P. J. 1994. Acetylcholinesterase inhibition in federally endangered colorado squawfish exposed to carbaryl and malathion. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 13, p. 935-939.

Birge, W. J.; Black, J. A. & Westerman, A. G. 1985. Short-term fish and amphibian embryo-larval testes for determining the effects of toxicant stress on early life stages and estimating chronic values for single compounds and complex effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 4, p. 807-821.

Brackenbury, J. 2000. Locomotory modes in the larva and pupa of *Chironomus plumosus* (Diptera, Chironomidae). **Journal of Insect Physiology**. v. 46, p.1517–1527.

Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 72, p. 248-254.

Braga, I. A. & Valle, V. 2007a. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 16, p. 279-293.

Braga, I. A. & Valle, V. 2007b. *Aedes aegypti*: histórico do controle no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 16, p. 113-118.

Buchwalter, D. B.; Sandahl, J. F.; Jenkins, J.J & Curtis, L. R. 2004. Roles of uptake, biotransformation, and target site sensitivity in determining the differential toxicity of chlorpyrifos to second to fourth instar *Chironomus riparius* (Meigen). **Aquatic Toxicology**. v. 66, p. 149-157.

Buratini, S.V.; Bertoletti, E. & Zagatto, P.A. 2004. Evaluation of *Daphnia similis* as a test species in ecotoxicological assays. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** . v. 73, p. 878-882.

Cailleaud, K.; Maillet, G.; Budzinski, H.; Souissi, S. & Forget-Leray, J. 2007. Effects of salinity and temperature on the expression of enzymatic biomarkers in *Eurytemora affinis* (Calanoida, Copepoda). Comparative **Biochemistry and Physiology**, Part A. v. 147, p. 841-849.

Callaghan, A.; Hirthe, G.; Fisher, T. & Crane, M. 2001. Effects of short-term exposure to chlorpyrifos on biochemical, behavioural and life-history biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 50, p.19-24.

Callaghan, A.; Fisher, T. C.; Grosso, A.; Holloway, G. J. & Crane, M. 2002. Effect of Temperature and Pirimiphos Methyl on Biochemical Biomarkers in *Chironomus riparius* Meigen. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 52, p. 128-133.

Choi, J.; Roche, H. & Caquet, T. 2001. Hypoxia, hyperoxia and exposure to potassium dichromate or fenitrothion alter the energy metabolism in *Chironomus riparius* Mg. (Diptera: Chironomidae) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology & Pharmacology*. v. 130, p. 11-17.

Coffman, W. P. 1995. Conclusions. In: Armitage, P. D.; Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. **The chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. London: Chapman and Hall. p 436-447.

Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA 357/05 – Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: <www.mma.gov.br>. Acesso em: 20/10/2011.

Conners, D. E. & Black, M. C. 2004. Evaluation of lethality and genotoxicity in the freshwater mussel *Utterbackia imbecillis* (Bivalvia: Unionidae) exposed singly and in combination to chemicals used in Lawn Care. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. v. 46, p. 362-371.

Crane, M.; Sildanchandra, W.; Kheir, R.; Callaghan, A. 2002. Relationship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus tentans* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 53, p. 361-369.

Day, K. & Scott, I. 1990. Use of AChE to detect sublethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentrations of organophosphorus pesticides. **Aquatic Toxicology**. v. 18, p. 101-104.

Domingues, I.; Guilhermino, L.; Soares, A. M. V. M. & Nogueira, A. J. A. 2007. Assessing dimethoate contamination in temperate and tropical climates: Potential use of biomarkers in bioassays with two chironomid species. **Chemosphere**. v. 69, p. 145-154.

Domingues, I.; Agra, A. R.; Monaghan, K.; Soares, A. M. V. M. & Nogueira, A. J. A. 2010. Cholinesterase and glutathione S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. **Environmental Toxicology & Chemistry**. v. 29, p. 5–18.

Dornfeld, C. B. 2006. **Utilização de *Chironomus sp.* (Diptera, Chironomidae) para Avaliação da Qualidade de Sedimentos e Contaminação por Metais**. Ph.D. Thesis, University of São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Ellmann, G. L.; Courtney, K. D.; Andreas, V. J. & Featherstone, R. M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7, p. 88-95.

Environmental Canada. 1990. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Report EPS 1/RM/12. 85 p.

Fonseca, A. L. 1997. **Avaliação da Qualidade da Água do Rio Piracicaba/SP Através de Testes de Toxicidade com Invertebrados**. Ph.D. Thesis, University of São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil.

Forcella, M.; Berra, E.; Giacchini, R.; Rossaro, B. & Parenti, P. 2007. Increased alanine concentration is associated with exposure to fenitrothion but not carbamates in *Chironomus riparius* larvae. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 66, p. 326-334.

Forget, J.; Livet, S. & Leboulenger, F. 2002. Partial Purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Poppe). **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 132, p. 85-92.

Fox, J. 2003. Effect displays in R for generalised linear models. **Journal of Statistical Software**. v. 8, p.1-27.

Fulton, M. H. & Key, P. B. 2001. Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 20, p. 37–45.

Galloway, T. & Handy, R. 2003. Immunotoxicity of organophosphorous pesticides. **Ecotoxicology**. v. 12, p. 345-363.

Gorokhova, E.; Löf, M.; Halldórsson, H. P.; Tjärnlund, U.; Lindström, M.; Elfving, T. & Sundelin, B. 2010. Single and combined effects of hypoxia and contaminated sediments on the amphipod *Monoporeia affinis* in laboratory toxicity bioassays based on multiple biomarkers. **Aquatic Toxicology**. v. 99, p. 263-274.

Guaratini, T.; Cardozo, K. H. M.; Pavanelli, D. D.; Colepicolo, P. & Pinto, E. 2008. In: Oga, S.; Camargo, M. M. A. & Batistuzzo, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu. p.127-141.

Guilhermino, L. 1996. **Modelos e sistemas de avaliação da toxicidade de substâncias químicas**. Ph.D. Thesis, University of Coimbra, Coimbra, Portugal..

Guimarães, A. T. B.; Silva de Assis, H. C. ; Boerger, W. 2007. The effect of Trichlorfon on acetylcholinesterase activity and histopathology of a cultivated fish *Oreochromis niloticus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 68, p. 57-62.

Halpern, M.; Gasith, A.; Bresler, V. M. & Broza, M. 2002. The protective nature of *Chironomus luridus* larval tubes against copper sulfate. **Journal of Insect Science**. v. 2, p. 1-5.

Hemingway, J. & Karunaratne, H. P. P. 1998. Mosquito carboxylesterases: a review of the molecular biology and biochemistry of a major insecticide resistance mechanism. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 12, p. 1-12.

Hemingway, J. & Ranson, H. 2000. Inseticide resistance in insect vectors of human disease. **Annual Reviews of Entomology**. v. 45, p. 371-391.

Hernández-Moreno, D.; Pérez-López, M.; Soler, F.; Gravato, C. & Guilhermino, L. 2011. Effects of carbofuran on the sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): Study of biomarkers and behaviour alterations. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74, p. 1905-1912.

Hochachka, P. W. & Somero, G. N. 1984. **Biochemical adaptation**. Princenton University Press, Princenton, NJ. 537p.

Hogan, J. W. 1970. Water temperature as a source of variation in specific activity of brain acetylcholinesterase of bluegills. **Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology**. v. 5, p. 347-353.

Hothorn, T., F. Bretz & P. Westfall. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. **Biometrical Journal**. v. 50, p. 346-363.

Huggett, R. J.; Kimerie, R. A.; Mehrie Jr., P. M. & Bergman, H. L. 1992. **Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress**. Boca Raton: Lewis Publishers. 347p.

Hwang, H.; Fisher, S. W. & Landrum, P. F. 2001. Identifying body residues of HCBP associated with 10-d mortality and partial life cycle effects in the midge, *Chironomus riparius*. **Aquatic Toxicology**. v. 52, p. 251-267.

Jemec, A.; Drobne, D.; Tisler, T.; Trebse, P.; Ros, M. & Sepcic, K. 2007. The applicability of acetylcholinesterase and glutathione S-transferase in *Daphnia magna* toxicity test. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 144, p. 303-309.

Jin-Clark, Y.; Anderson, T. D. & Zhu, K. Y. 2008. Effect of Alachlor and Metolachlor on Toxicity of Chlorpyrifos and Major Detoxification Enzymes in the Aquatic Midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 54, p. 645-652.

Jonusaite, S.; Kelly, S. P. & Donini, A. 2011. The physiological response of larval *Chironomus riparius* (Meigen) to abrupt brackish water exposure. **Journal of Comparative Physiology, Part B**. v. 181, p. 343-352.

Keizer, J.; D'Agostinho, G.; Nagel, R.; Volpe, T.; Gnemi, P. & Vittozzi, L. 1995. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species. **The Science of the Total Environment**. v. 171, p. 213-220.

Keller, A. E. & Ruessler, D. S. 1997. The toxicity of malathion to unionid mussels: Relationship to expected environmental concentrations. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 16, p. 1028-1033.

Koivisto, S. 1995. Is *Daphnia magna* an ecologically representative zooplankton species in toxicity tests? **Environmental Pollution**. v. 90, p. 263-267.

Koodalingam, A.; Mullainadhan, P. & Arumugam, M. 2011. Effects of extract of soapnut *Sapindus emarginatus* on esterases and phosphatases of the vector mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Acta Tropica**. v. 118, p. 27-36.

Kristoff, G.; Guerrero, N. V.; D'Angelo, A. M. P. & Cochón, A. C. 2006. Inhibition of cholinesterase activity by azinphos-methyl in two freshwater invertebrates: *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*. **Toxicology**. v. 222, p. 185-194.

Lagauzère, S.; Pischedda, L.; Cuny, P.; Gilbert, F.; Stora, G. & Bonzom, J. M. 2009. Influence of *Chironomus riparius* (Diptera, Chironomidae) and *Tubifex tubifex* (Annelida, Oligochaeta) on oxygen uptake by sediments. Consequences of uranium contamination. **Environmental Pollution**. v. 157, p. 1234-1242.

Laguerre, C.; Sanchez-Hernandez, J. C.; Köhler, H. R.; Triebskorn, R.; Capowiez, T.; Rault, M. & Mazzia, C. 2009. B-type esterases in the snail *Xeropicta derbentina*: An enzymological analysis to evaluate their use as biomarkers of pesticide exposure. **Environmental Pollution**. v. 157, p. 199-207.

Lee, S. M.; Lee, S. B.; Park, C. H. & Choi, J. 2006. Expression of heat shock protein and hemoglobin genes in *Chironomus tentans* (Diptera, chironomidae) larvae exposed to various environmental pollutants: a potential biomarker of freshwater monitoring. **Chemosphere**. v. 65, p. 1074 - 1081.

Lee, S. W. & Choi, J. 2009. Multi-level ecotoxicity assay on the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera, Chironomidae) exposed to octachlorostyrene. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 28, p. 269-274.

Lionetto, M. G.; Caricato, R.; Giordano, M. E.; Pascariello, M. F.; Marinosci, L. & Schettino, T. 2003. Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area. **Marine Pollution Bulletin**. v. 46, p. 324-330.

Livingstone, D. R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part A**. v. 120, p. 43-49.

Lundebye, A. K.; Curtis, T. M.; Braven, J. & Depledge, M. H. 1997. Effects of the organophosphorous pesticide, dimethoate, on cardiac and acetylcholinesterase (AChE) activity in the shore crab *Curcinus maenas*. **Aquatic Toxicology**. v. 40, p. 23-36.

Maier, K.J.; Kosalwat, P. & Knight, A. W. 1990. Culture of *Chironomus decorus* (Diptera: Chironomidae) and the Effect of Temperature on its Life History. **Environmental Entomology**. v. 19, p. 1681-1688.

Maycock, D. S.; Prenner, M. M.; Kheir, R.; Morris, S.; Callaghan, A.; Whitehouse, P.; Morritt, D. & Crane, M. 2003. Incorporation of in situ and biomarker assays in higher-tier assessment of the aquatic toxicity of insecticides. **Water Research**. v. 37, p. 4180-4190.

Mehler, W. T.; Schuler, L. J. & Lydy, M. J. 2008. Examining the joint toxicity of chlorpyrifos and atrazine in the aquatic species: *Lepomis macrochirus*, *Pimephales promelas* and *Chironomus tentans*. **Environmental Pollution**. v. 152, p. 217-224.

Menezes, S.; Soares, A. M. V. M.; Guilhermino, L. & Peck, M., 2006. Biomarker responses of the estuarine brown shrimp *Crangon crangon* L. to non-toxic stressors: temperature, salinity and handling stress effects. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 335, p. 114–122.

Michaud, M. R.; Benoit, J. B.; Lopez-Martinez, G.; Elnitsky, M. A.; Lee Jr., R. E. & Denlinger, D. L. 2008. Metabolomics reveals unique and shared metabolic changes in response to heat shock, freezing and desiccation in the Antarctic midge, *Belgica antarctica*. **Journal of Insect Physiology**. v. 54, p. 645-655.

Monteiro, M.; Quintaneiro, C.; Morgado, F.; Soares, A. M. V. M. & Guilhermino, L. 2005. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: Application to biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 62, p. 341-347.

Mozeto, A. A. & Zagatto, P. A. 2008.14-38. Introdução de agentes químicos no ambiente. In: Zagatto, p. A. & Bertoletti, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 2ª ed. São Carlos, Brasil: Rima. p.14-38.

Murias, M.; Rachtan, M. & Jodynys-Liebert, J. 2005. Effect of multiple freeze–thaw cycles of cytoplasm samples on the activity of antioxidant enzymes. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**. v. 52, p. 302-305.

National Pesticide Information Center (NPIC). 2010. **Malathion – Technical fact sheet**. Oregon State University. 17p.

Nyman, M.; Korhola, A. & Brooks, S. J. 2005. The distribution and diversity of Chironomidae (Insecta: Diptera) in western Finnish Lapland, with special emphasis on shallow lakes. **Global Ecology and Biogeography**. v. 14, p. 137-153.

Olsen, T.; Ellerbeck, L.; Fisher, T.; Callaghan, A. & Crane, M. 2001. Variability in acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities in *Chironomus riparius* Meigen deployed in situ at uncontaminated field sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 20, p. 1725-1732.

Osborne, S.; Hurrell, S.; Simkiss, K. & Leidi, A. 2000. Factors influencing the distribution and feeding of the larvae of *Chironomus riparius*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**. v. 94, p. 67-73.

Pfeifer, S.; Schiedek, D. & Dippner, J. W. 2005. Effect of temperature and salinity on acetylcholinesterase activity, a common pollution biomarker, in *Mytilus sp.* from the south-western Baltic Sea. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. v. 320, p. 93-103.

Pinder, L. C. V. 1995. The habitats of chironomid larvae. In: Armitage, P. D.; Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. **The chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. London: Chapman and Hall, p 107–135.

Printes, L. B.; Espíndola, E. L. G. & Fernandes, M. N. 2007. Biochemical biomarkers in individual larvae of *Chironomus xanthus* (Rempel, 1939) (Diptera, Chironomidae). **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**. v. 2, p. 53–60.

Printes, L. B.; Fernandes, M. N. & Espíndola, E. L. G. 2011. Laboratory measurements of biomarkers and individual performances in *Chironomus xanthus* to evaluate pesticide contamination of sediments in a river of southeastern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 74, p. 424-430.

R Development Core Team 2011. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.

Rakotondravelo, M. L.; Anderson, T. D.; Charlton, R. E. & Zhu, K. Y. 2006. Sublethal effects of three pesticides on activities of selected target and detoxification enzymes in the aquatic midge, *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 51, p. 360-366.

Ribeiro, L. O. & Uieda, V. S. 2005. Estrutura da comunidade de macroinvertebrados bentônicos de um riacho de serra em Itatinga, São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 22, p. 613-618.

Rickwood, C. J. & Galloway, T. S. 2004. Acetylcholinesterase inhibition as a biomarker of adverse effect A study of *Mytilus edulis* exposed to the priority pollutant chlorfenvinphos. **Aquatic Toxicology**. v. 67, p. 45-56.

Roex, E. W. M.; Keijzers, R. & van Gestel, C. A. M. 2003. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**. v. 64, p. 451-460.

Rojas-García, A. E.; Medina-Díaz, I. M.; Robledo-Marengo, M. L.; Barrón-Vivanco, B. S. & Pérez-Herrera, N. 2011. Pesticide Biomarkers. In: Stoytcheva, M. **Pesticide in the modern world – Pests control and pesticides exposure and toxicity assessment**. Rijeka, Croatia: In Tech. p. 161-190.

Rufer, M. M. & Ferrington Jr, L. C. 2008. Sampling frequency required for chironomid community resolution in urban lakes with contrasting trophic states. **Boletim do Museu Municipal do Funchal**. v. 13, p. 77-84.

Santos, V. M. R.; Donnici, C. L.; DaCosta, J. B. N. & Caixeiro, J. M. R. 2007. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**. v. 30, p. 159-170.

Scaps, P. & Borot, O. 2000. Acetylcholinesterase activity of the polychaete *Nereis diversicolor*: effects of temperature and salinity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**. v. 125, p. 377-383.

Secretaria de Estado da Agricultura e Abastecimento do Paraná. Disponível em: < www.seab.pr.gov.br >. Acesso em: 25/10/2011.

Sharbidre, A. A.; Metkari, V. & Patode, P. 2011. Effect of methyl parathion and chlorpyrifos on certain biomarkers in various tissues of guppy fish, *Poecilia reticulata*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 101, p. 132-141.

Silva de Assis, H. C. 1998. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung vom gewässerverschmutzungen**. . Ph.D. Thesis, University of Berlin, Berlin, Germany.

Stevens, M. M. 1992. Toxicity of organophosphorus insecticides to 4th-instar larvae of *Chironomus tepperi* Skuse (diptera, chironomidae). **Journal of the Australian Entomological Society**. v. 31, p. 335-337.

Strixino, G. & Trivinho-Strixino, S. 1985. A temperatura e o desenvolvimento larval de *Chironomus sancticaroli* (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 3, p.177-180.

Strixino, G. & Trivinho-Strixino, S. 1998. Povoamento de Chironomidae (Diptera) em lagos artificiais. **Oecologia Brasiliensis**. v. 5, p. 141-154.

Strixino, S. T. 1980. **Estudos sobre a fecundidade de *Chironomus sancarlensis* (Diptera: Chironomidae)**. Ph.D. Tese, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brasil.

Strixino, S. T. & Strixino, G. 1981. Nova espécie do gênero *Chironomus* Meigen do sul do Brasil (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 25, p. 333-340.

Sturm, A. & Hansen, P.-D. 1999. Altered cholinesterase and monooxygenase levels in *Daphnia magna* and *Chironomus riparius* exposed to environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 42, p. 9-15.

Tessier, L.; Boisvert, J. L.; Vought, L. B.-M. & Lacoursière, J. O. 2000. Anomalies on capture nets of *Hydropsyche slossonae* larvae (Trichoptera; Hydropsychidae), a potential indicator of chronic toxicity of malathion (organophosphate insecticide). **Aquatic Toxicology**. v. 50, p. 125-139.

Thi Tu, H.; Silvestre, F.; De Meulder, B.; Thomé, J.-P.; Phuong, N. T. & Kestemont, P. 2012. Combined effects of deltamethrin, temperature and salinity on oxidative stress biomarkers and acetylcholinesterase activity in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Chemosphere**. v. 86, p. 83-91.

Tokeshi, M. 1995. Production ecology. In: Armitage, P. D.; Cranston, P. S. & Pinder, L. C. V. **The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges**. Chapman & Hall, London, UK, p.269-296.

Trivinho-Strixino, S. & Strixino, G. 1982. Ciclo de vida de *Chironomus sancticaroli* (Diptera, Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 26, p. 183-189.

Trivinho-Strixino, S. & Strixino, G. 1989. Observações sobre a biologia da reprodução de um quironomídeo da região neotropical (Diptera: Chironomidae). **Revista Brasileira de Entomologia**. v. 33, p. 207-216.

US Environmental Protection Agency (USEPA). 2000. **Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates**. EPA 600/R-99/064. Washington, DC. 212p.

Valle, D.; Montella, I. R.; Ribeiro, R. A.; Medeiros, P. F. V.; Martins-Jr, A. J. & Lima, J. B. P. 2006. **Quantification methodology for enzyme activity related to insecticide resistance in *Aedes aegypti***. Fundação Oswaldo Cruz and Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Rio de Janeiro and Distrito Federal. 129p.

Van der Oost, R.; Beyer, J. & Vermeulen, N. P. E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 13, p. 57-149.

Venables, W. N. & B. D. Ripley. 2002. **Modern Applied Statistics with S**. 4th ed. Springer, New York. 45p.

Walshe, B. M. 1951. The feeding habits of certain chironomid larvae (subfamily Tendipedinae). **Proceedings of Zoological Society of London**. v. 121, p. 63-79.

Wang, C.; Lu, G.; Cui, J. & Wang, P. 2009. Sublethal effects of pesticide mixtures on selected biomarkers of *Carassius auratus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 28, p. 414-419.

World Health Organization (WHO). 1993. International Programme on Chemical Safety (IPCS) – **Environmental Health Criteria 155: Biomarkers and risk assessment: concepts and principles**. Geneva. Disponível em: <<http://www.who.int>> Acesso em: 23/10/2011.

World Health Organization (WHO). 2003. **Specifications and evaluations for public health pesticides – Malathion**. Geneva. 75p.

Wood, J.M. 1974. Biological cycles for toxic elements in the environment. **Science**. v. 183, p. 1049-1052.

Xuereb, B.; Lefèvre, E.; Garric, J. & Geffard, O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. **Aquatic Toxicology**. v. 94, p. 114-122.

Zagatto, P. A. 2008. Ecotoxicologia. In: Zagatto, P. A. & Bertoletti, E. **Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações**. 2^a ed. São Carlos, Brasil: Rima. p. 1-13.